

Aus der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

***Revaskularisierung und Nachweis von
Myofibroblasten im freien
Sehnentransplantat nach vorderem
Kreuzbandersatz***

-Histologische 2-Jahres Untersuchung am Schaf-

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin
Berlin

von

Frank Norman Unterhauser

aus München

Dekane: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen
Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Hoffmann
2. Priv.-Doz. Dr. med. R. Becker
3. Priv.-Doz. Dr. med. A. Weiler

Datum der Promotion: 13.02.2004

Herrn Prof. Dr. med. R. F. Hoffmann möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas danken. Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. A. Weiler für die mir zu jeder Zeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit, sowie für seine große Geduld. Er stand mir stets mit wissenschaftlichem und freundschaftlichen Rat zur Seite.

Die Durchführung dieses Projektes, wie Operationen an den Versuchstieren, die Tierversorgung und die histologische Aufarbeitung der Präparate, wurde erst gemeinsam mit Frau Dr. Riccarda Peine und meinen Kommilitonen Herrn Clemens Abel, Herrn Ali-Reza Pashmineh-Azar, Herrn Oliver Rehm, Herrn Dr. Gunnar Peters und den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Hardung und Frau Princ möglich. Ihnen möchte ich hiermit nochmals für die jederzeit freundliche und hilfreiche Zusammenarbeit danken.

Meinen Eltern, für ihre stete Unterstützung und Geduld,
in Dankbarkeit gewidmet

Für Heike

1. EINLEITUNG	9
1.1 Kreuzbandverletzungen	9
1.2 Historie	10
1.3 Status Quo der Therapie	12
1.4 Anatomie	12
1.4.1 Makroskopie	12
1.4.2 Mikroskopische Anatomie	14
1.4.2.1 Zelluläre Bestandteile	14
1.4.2.2 Physiologische Blutversorgung des vorderen Kreuzbandes	15
1.4.2.3 Extrazellulärmatrix	16
1.4.2.4 Innervation	16
1.5 Transplantatremodeling	17
1.5.1 Initiale Phase (Nekrose und Degradation)	17
1.5.2 Revitalisierungsphase (Reparation und Proliferation)	18
1.5.3 Remodelingphase (bis zu 2 Jahren)	18
1.6 Revaskularisierung von Kreuzbandtransplantaten	19
1.7 Myofibroblasten (MFB)	20
1.8 Ziel der Untersuchung	22
2. MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 Studiendesign	24
2.2 Tiermodell und Standzeiten	24
2.3 Operatives Vorgehen	27
2.3.1 Prämedikation, Narkose und Analgesie	27
2.3.2 Operative Phase	28
2.3.3 Kreuzbandersatz	28

2.4 Explantation	30
2.5 Histologische Aufarbeitung	31
2.6 Konventionelle Färbungen	32
2.7 Immunhistologie	32
2.7.1 Theorie der Immunhistologie	32
2.8 Immunhistochemische Färbungen	33
2.8.1 Immunhistologische Darstellung der Revaskularisierung	34
2.8.2 Immunhistologische Darstellung der Myofibroblasten	34
2.9 Auswertung und Datenanalyse	35
2.9.1 Konventionelle Lichtmikroskopie	36
2.9.1.1 Zellcharakterisierung und morphologisches Erscheinungsbild	36
2.9.1.2 Revaskularisierung:	36
2.9.1.3 Myofibroblasten	37
2.9.2 Polarisationsmikroskopie	38
2.9.2.1 Kollagencrimp	38
2.10 Statistische Auswertung	39
3. ERGEBNISSE	40
3.1 Allgemeines	40
3.1.1 Komplikationen	40
3.1.2 Postoperativer Verlauf	40
3.2 Explantation	40
3.3 Makroskopische Auswertung	41
3.4 Mikroskopische Auswertung	42
3.4.1 Konventionelle Lichtmikroskopie	42
3.4.1.1 Zellcharakterisierung und morphologisches Erscheinungsbild	42
3.4.1.2 Crimp	45

3.4.2	Immunhistologie	48
3.4.2.1	Vaskularisierung und Revaskularisierung	48
3.4.2.2	Myofibroblasten	52
4.	DISKUSSION	56
5.	ZUSAMMENFASSUNG	65
	LITERATUR	67
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	80
	ANHANG	85
	Spezielles Op-Instrumentarium	85
	Reagenzien und verwendete Pharmaka	85
	Untersuchungsmaterialien	86
	Erklärung an Eides Statt	88
	Curriculum vitae	89
	Veröffentlichungen	91

1. Einleitung

1.1 Kreuzbandverletzungen

Das vordere Kreuzband (VKB) stellt den zentralen Pfeiler des Kniegelenkes dar. Sowohl in Streckung als auch in gebeugter Position sind stets Teile des Bandes gespannt und dienen somit der Führung und Stabilisierung der Roll-Gleit-Bewegung des Gelenkes. Verletzungen des vorderen Kreuzbandes können zu einer anterioren Subluxation des Knies führen und damit zu einer gravierenden Instabilität, welche die Funktion des Gelenkes einschränkt **(28,44,94)**. Ohne die zentrale Führung der Roll-Gleit-Bewegung durch das vordere Kreuzband, kommt es sekundär zu einer progredienten Schädigung der Menisken und des Gelenkknorpels, mitunter bis zur frühzeitigen Arthrose des Kniegelenks **(8,39,83,125)**. Im Gegensatz zu anderen Bandstrukturen des Knies, wie zum Beispiel den Kollateralbändern **(43,58)**, zeigt das rupturierte VKB eine geringe bis nicht vorhandene Heilungspotenz **(85-87)**.

Der Anteil an Kniebinnenverletzungen hat in der Vergangenheit durch die rasante Zunahme an Kontaktsportarten und kniebelastenden Sportarten, wie z.B. dem Skiabfahrtslauf, erheblich zugenommen **(119)**. So werden beispielsweise in den USA ca. 50.000 Kreuzbandoperationen pro Jahr durchgeführt **(1)**. Dabei haben sich die Resultate nach Kreuzbandersatz durch Optimierung von minimal invasiven Techniken, wie das arthroskopische, bzw. das arthroskopisch assistierte Vorgehen, in den letzten Jahren erheblich verbessert. Einen wesentlichen Betrag dazu haben umfangreiche klinische und tierexperimentelle Studien geleistet, in denen biomechanische Untersuchungen bei Verwendung verschiedener Transplantate durchgeführt wurden. Dabei läßt sich feststellen, daß das Wissen und Verständnis der funktionellen Anatomie "die wichtigste Grundlage des Chirurgen zur Rekonstruktion und Heilung" nach Verletzung des vorderen Kreuzbandes **(38)** ist.

Die vorliegende Arbeit soll weiteren Aufschluß über die biologischen Grundlagen des Einheilungs- und Reifungsprozesses eines freien Sehnentransplantates nach Kreuzbandersatz geben.

1.2 Historie

Erste Beschreibungen von Anatomie und Funktion der Kreuzbänder des Kniegelenkes gehen auf Galen von Pergamon um 200 v.Chr. zurück. Jedoch erst Ende des 19. Jahrhunderts wurde 1845 mit der Arbeit von Amédée Bonnet über „die Behandlung von Gelenkerkrankungen“ der Grundstein für die moderne Kniechirurgie gelegt **(22,23)**. Er berichtete anhand von Kadaverstudien über die Mechanismen von Kniebandverletzungen und beschrieb Begleitphänomene wie Hämarthros und das Subluxationsphänomen der Tibia nach Ruptur des vorderen Kreuzbandes. In den folgenden Jahren wurden weitere Erkenntnisse über den Pathomechanismus der VKB-Ruptur gewonnen **(37,82,102,109)** und erste konservative Behandlungsmethoden ausgearbeitet **(76)**.

Der erste schriftlich belegte chirurgische Eingriff wurde 1885 von Mayo Robson im General Infirmary, Leeds, England durchgeführt. Er vernähte erstmals die Kreuzbänder eines Minenarbeiters mit chronischer Knieinstabilität **(75)**.

Die ersten Rekonstruktionen des vorderen Kreuzbandes wurden Anfang des 20. Jahrhunderts von Hey Groves (1917) **(56)** und Alwyn Smith (1918) **(108)** durchgeführt. Beide verwendeten ein gestieltes Tractus iliotibialis Autotransplantat zur intraartikulären Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes. Diese Technik sollte der Vorläufer aller modernen intraartikulären Kreuzbandrekonstruktionen werden.

Neben der Entwicklung und Verbesserung neuer operativer Techniken wurden auch neue Untersuchungstechniken entwickelt. So wurde bereits 1913 von Jones und Smith das Phänomen des “pivot shift” beschrieben – in der Orthopädie heute eines der etablierten klassischen Zeichen der vorderen Knieinstabilität **(64)**.

In den Jahren zwischen 1919 und 1930 wurden durch die Entwicklung von Arthrographie und Arthroskopie die Diagnostik und die Versorgung von Kreuzbandverletzungen revolutioniert **(19,20,27,68)**. Nach ersten Versuchen des Japaners Kenji Takagi 1918 mit einem Zystoskop in das Innere eines Kniegelenkes zu blicken, konnte der Schweizer Eugen Bircher seine arthroskopischen Erfahrungen an Leichenknien mit einem Jacobus Laparoskop Anfang der zwanziger Jahre am Menschen anwenden **(19,20)**.

Ab 1930 folgte dann eine Reihe von Fallberichten **(26,34,35,74)** über verschiedene operative Verfahren zur Behandlung der VKB - Instabilität. 1936 und 1939 berichteten

Campbell et al erstmalig über die Verwendung der Patellarsehne als Ersatz für ein frisch rupturiertes VKB **(29,30)**.

Erst 1938 wurde durch Ivar Palmer die Knieinstabilität erstmals ganzheitlich betrachtet. In einem umfangreichen Werk berichtete er von klinischen sowie experimentellen Studien über Anatomie, Biomechanik, Diagnostik und Behandlung von Verletzungen des vorderen Kreuzbandes **(88)**.

In den fünfziger und sechziger Jahren des 20. Jahrhunderts begann die moderne Zeit der Kreuzbandchirurgie. Mit der 1950 herausgegebenen Arbeit von O'Donoghue über die Notwendigkeit einer frühen Diagnose und operativen Versorgung frischer Kreuzbandverletzungen **(84)**, begann eine lange Serie von Publikationen. In umfangreichen wissenschaftlichen Studien wurden teils neue, teils schon wieder in Vergessenheit geratene operative Techniken zur Versorgung von VKB-Rupturen veröffentlicht **(15,54,69,85,110)**.

Mitte der siebziger Jahre galt der besondere Augenmerk auf der Diagnosefindung und der Behandlung von Rotationsinstabilitäten des VKB-defizienten Knies. MacIntosh et al. beschrieben den „pivot shift“ als pathognomonisch für die VKB-Insuffizienz **(49)**. Slocum et al **(107)**, sowie Losee und Mitarbeiter **(71)** beschrieben Variationen des „pivot shift“-Tests, um die vordere tibiale Subluxation zu diagnostizieren. Torg et al zeigten in fundierten biomechanischen Untersuchungen die Überlegenheit des Lachmantests gegenüber dem vorderen Schubladentest **(114)**.

Mit den achtziger Jahren kam die Zeit der künstlichen Kreuzbandersatzes. Materialien wie Nylon **(118)**, Dacron und Teflon **(77,89,95,97)**, Polypropylen **(50,65)** sowie Carbonfäden **(31,61,98,124)** fanden eine breite Verwendung. Ende der siebziger und Anfang der achtziger Jahre begann man, alte, vergessene Verfahren der Kniestabilisierung wiederaufzugreifen und mit Hilfe neuerer Techniken und besserem Wissen um die Kniekinematik zu modifizieren. So wurden Hamstringsehnen (Sehnen der Mm. gracilis und semitendinosus) **(72)**, iliotibiales Band **(56,108)** und Patellarsehne (Campbell 1930 und 1936) **(30,78)** als Ersatzmaterialien des rupturierten VKB wieder neu entdeckt.

In den folgenden Jahren wurden zunehmend Langzeitstudien durchgeführt, in denen die verschiedensten Rekonstruktionstechniken im Zusammenhang mit postoperativer Immobilisierung und unterschiedlichen Rehabilitationsprotokollen untersucht wurden. Erstmals wurden auch Vergleiche zwischen operativer und konservativer Therapie

nach Kreuzbandläsion angestellt. Durch Studien von Feagin und Curl **(41)**, Arnold et al **(13)**, Arnoczky et al **(11)**, Fetto und Marshall **(42)**, sowie Youmans **(126)** wurde das intakte vordere Kreuzband als wichtigste Voraussetzung für eine Langzeitfunktion des Kniegelenkes herausgearbeitet und die Notwendigkeit der Rekonstruktion nach Ruptur allgemein hin propagiert.

1.3 Status Quo der Therapie

In der aktuellen Diskussion bezüglich der Transplantatwahl zum Kreuzbandersatz werden heute nur autologe und, mit einigen Einschränkungen, allogene (Spendergewebe) Sehnentransplantate empfohlen. Beim intraartikulären Ersatz des vorderen Kreuzbandes kann die Verwendung autologer Transplantate wie der Patellarsehne, der Pes Anserinussehnen oder der Quadrizepssehne als Standardverfahren angesehen werden. Alle übrigen Transplantate der Vergangenheit, wie der Tractus iliotibialis oder künstliche Materialien, haben praktisch keine klinische Bedeutung mehr.

1.4 Anatomie

1.4.1 Makroskopie

Das vordere Kreuzband verbindet zusammen mit dem hinteren Kreuzband als straffe Bandverbindung Femur und Tibia. Es entspringt der medialen Wange des lateralen Femurkondylus weit posterior in der Fossa intercondylaris. Der Ursprung hat eine Insertionsfläche von ca. 16-24 mm Durchmesser und beschreibt einen Halbkreis dessen plane Fläche nach anterior orientiert ist. Ihm entspringen von posterior ein antero-mediales (AMB) und von weiter anterior ein postero-laterales Bündel (PLB), welche durch den Gelenkbinnenraum zur tibialen Ansatzstelle ziehen. Die freie Länge des VKB beträgt dabei 31-38 mm **(70)**. Dabei kreuzen die Bündel das hintere Kreuzband, welches von einem breit gefächerten Ursprung anterior an der lateralen Wange des medialen Femurkondylus nach dorsal zu seiner Insertionsstelle an der Area intercondylaris posterior der Tibia zieht. Die beiden Hauptbündel des VKB sind nicht voneinander isoliert und lassen sich im Gegensatz zum Vierbeiner beim Menschen nicht immer klar voneinander trennen.

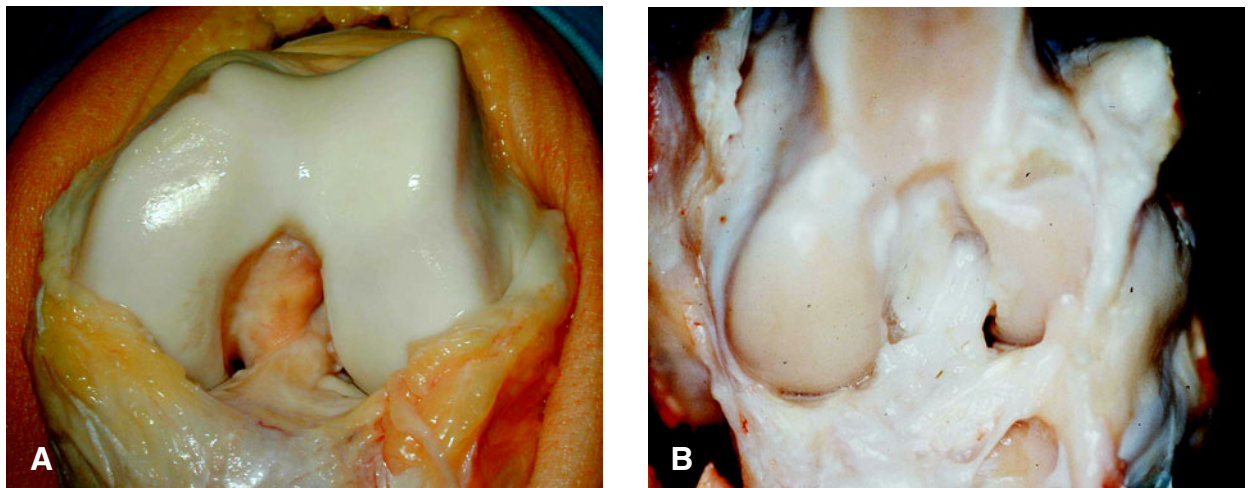


Abbildung 1: A. Humanes Kniegelenk mit Blick auf Kreuzbänder und Femurkondylen. B. Ovines Kniegelenk mit Blick auf Kreuzbänder und Femurkondylen.

Die beiden Bündel bilden dabei stets eine funktionelle Einheit, in der, während der Kniebeugung (AMB) und Streckung (PLB), stets ein Anteil gespannt ist. Diese Funktionalität rührt von den weit aufgefächerten Ursprungs- und Insertionsflächen her. Das VKB inseriert tibial auf einer Fläche von 11 mm Breite und 17 mm antero-posterioren Ausdehnung. Dabei inserieren die von femoral weit posterior entspringenden Fasern im vorderen Anteil der Insertionsfläche, teilweise reichen sie bis unter das Ligamentum transversum. Der von femoral anterior entspringende Anteil inseriert im hinteren Anteil der Insertionsfläche.

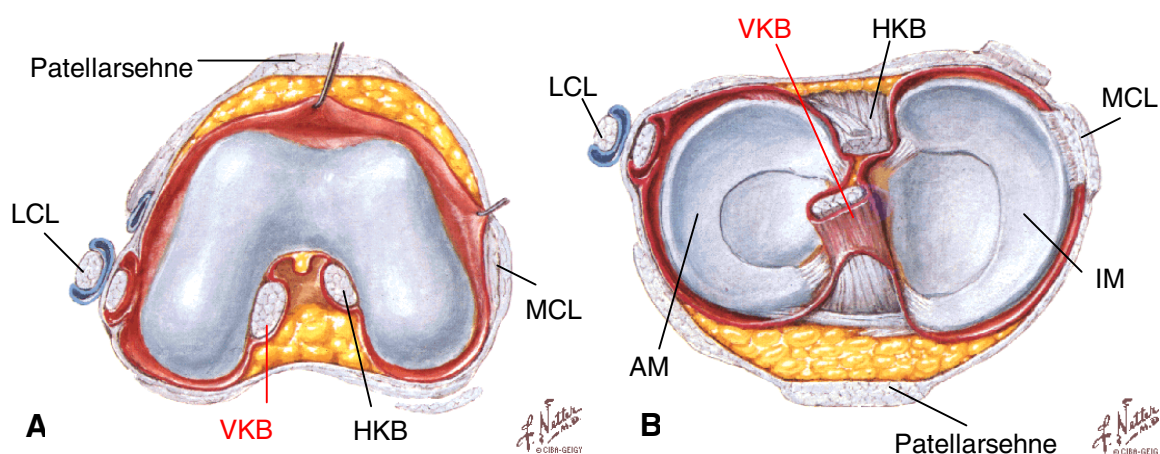


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Ursprunges und Ansatzes der Kreuzbänder im Kniegelenk (aus F. H. Netter Interactive atlas of human anatomy): A: Ansicht der Femurkondylen von inferior. B: Ansicht des Tibiaplateaus mit Menisken von superior. (VKB = vorderes Kreuzband, HKB = hinteres Kreuzband, MCL = mediales Kollateralband, LCL = laterales Kollateralband, AM = Außenmeniskus, IM = Innenmeniskus)

Einleitung

Dadurch kommt es zu einer Verdrehung des VKB und zu der beschriebenen fortwährenden Spannung einzelner Faserbündel. Die beiden Kreuzbänder werden von einer reichlich durchbluteten synovialen Hülle überzogen und werden so vom Gelenkbinnenraum getrennt **(38,91)**.

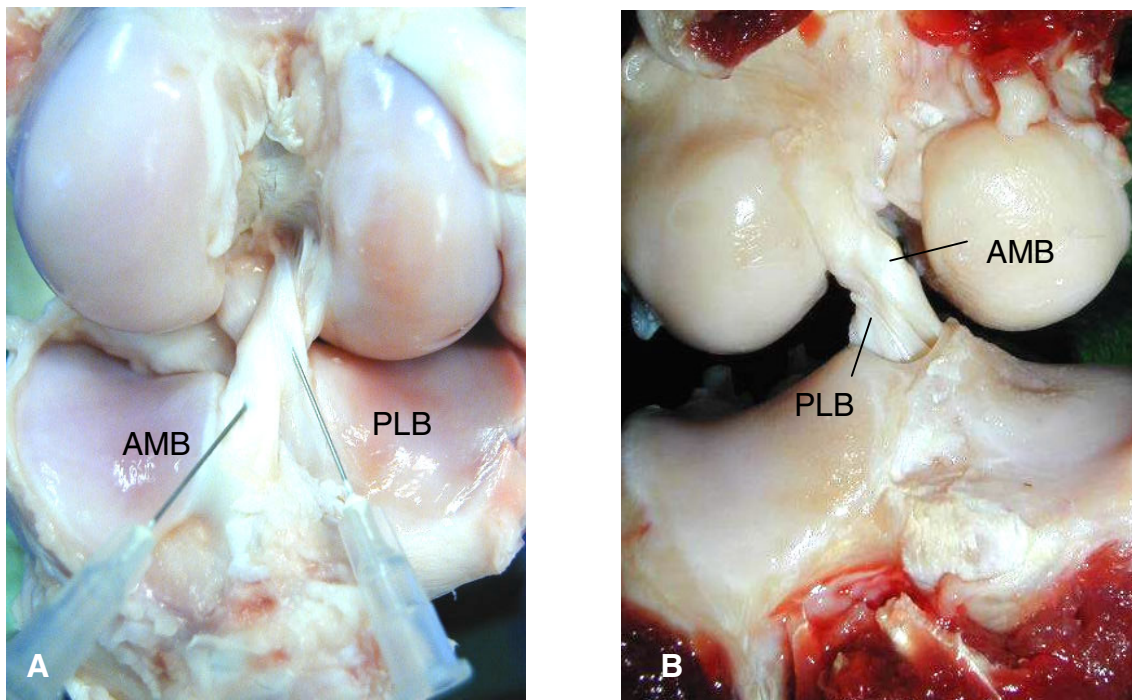


Abbildung 3: Das vordere Kreuzband des Schafes lässt sich deutlich in ein kräftigeres antero-mediales (AMB) und ein postero-laterales (PLB) Bündel unterteilen, wobei stets ein Anteil während Beugung und Streckung gespannt ist. A.: Ansicht von ventral, B.: Ansicht von dorsal.

1.4.2 Mikroskopische Anatomie

1.4.2.1 Zelluläre Bestandteile

Der dominierende Zelltyp im Bandgewebe wie dem VKB sind die Fibroblasten.

Die Fibroblasten liegen perlschnurartig entlang der Längsachse des Bandes zwischen den kollagenen Fasern. Ihre Form variiert je nach Aktivitätszustand zwischen spindelförmig (Fibrozyten, wenig aktiv) und rundzellig-ovoid (Fibroblasten, starke Syntheseaktivität). Sie gehören zu den ortsständigen Zellen und regulieren den Auf- und Abbau der Extrazellulärsubstanzen. Im Rahmen des Remodelingprozesses nach vorderem Kreuzbandersatz sind Fibroblasten somit von entscheidender Bedeutung für den Wiederaufbau des Kollagengerüsts im Transplantat. Mit dem in das avitale

Transplantat einwachsenden Granulationsgewebe gelangen Fibroblasten in das alte Kollagengewebe und steuern gemeinsam mit nicht untergegangenen Fibroblasten des Transplantates den Abbau der Sehnenmatrix und den Aufbau der Bandmatrix.

In wechselnder Anzahl finden sich weiterhin die freien Zellen, wie z.B. Histiozyten, Mastzellen, Plasmazellen, und diverse Granulozyten, deren Hauptaufgabe in der Immunabwehr besteht und über die Blutgefäße in das Bandgewebe gelangen **(6,112,125)**.

1.4.2.2 Physiologische Blutversorgung des vorderen Kreuzbandes

Die Blutversorgung des vorderen Kreuzbandes wird hauptsächlich über die A. genicularis medialis und am tibialen Ansatz von einigen Ästen der A. genicularis medialis inferior, die der Arteria poplitea entspringt, gewährleistet **(9,91)**. Die Blutgefäße gelangen durch den infrapatellären Fettkörper und über eine dorsale synoviale Umschlagfalte in das Gelenk und verzweigen sich periligamentär in einem synovialen Netzwerk kapillärer Gefäße **(9)**.

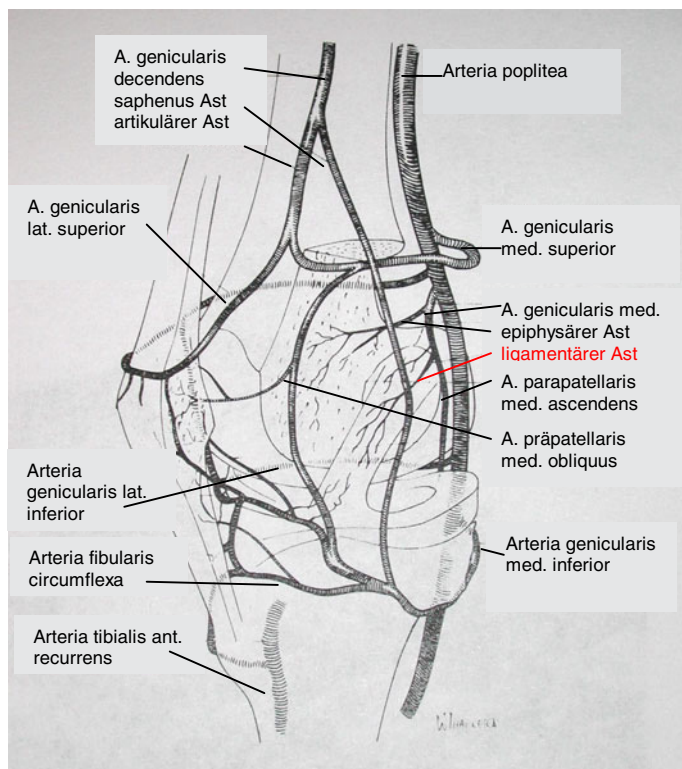


Abbildung 4: Schematische Zeichnung von Lage und Verlauf der das Knie versorgenden Arterien.

Hinteres und vorderes Kreuzband werden von der Synovialis wie von einem Schlauch umhüllt. Aus ihr treten über kurze Anastomosen die periligamentären Gefäße in Verbindung mit dem feinen endoligamentären Kapillarnetz das longitudinal entlang der Kollagenfaserbündel ausgerichtet ist **(4)**. Der mittlere Anteil des VKB ist weniger gut durchblutet als der femorale und tibiale Ansatz, der direkte ossäre Ansatz bleibt jedoch gefäßfrei. Ebenso fehlen ossär-ligamentäre Gefäßanastomosen, jedoch konnten Anastomosen der periligamentären Synovialis mit dem Periost sowie dem endostalen Raum nachgewiesen werden **(91,105)**.

1.4.2.3 Extrazellulärmatrix

Die Extrazellulärsubstanz oder -matrix (EZM) unterteilt sich in ungeformte Grundsubstanzen (Mucopolysaccharide, Glykoproteine und Proteoglykane) die aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften Wasser an sich binden können und den Zusammenhalt der geformten faserigen Anteile gewährleisten. Das VKB besteht zu 60% seines Feuchtgewichts aus Wasser. Die festen faserigen Bestandteile bilden hauptsächlich Kollagene und zu geringen Anteilen Elastine und retikuläre Fasern. 75% des Trockengewichts machen Kollagene aus, 90% davon Kollagen Typ I und nur zu 10 % Typ III. Die Fibroblasten produzieren Tropokollagen, das nach Ausschleusung aus den Fibroblasten an der Zelloberfläche zu ca. 5 nm großen Protofibrillen kondensiert. Unter Einwirkung von Zugspannungen erfolgt die Kristallisation zu 10–100 nm langen Mikrofibrillen. Diese lagern sich zu Kollagenfibrillen (200-400 nm) zusammen, welche sich zu den eigentlichen kollagenen Fasern (1-10 µm) formieren. Die Kollagenfasern besitzen ein großes Elastizitätsmodul das eine hohe Zugbeanspruchung übersteht und bilden so die Voraussetzung für die straffe Bandverbindung von Femur und Tibia durch das vordere Kreuzband **(112,125)**.

1.4.2.4 Innervation

Die Innervation des VKB erfolgt hauptsächlich über feine Äste des Nervus articularis posterior, der aus dem N. tibialis entspringt. Diese gelangen über die dorsale Umschlagfalte der Synovialis in das Gelenk und ziehen zusammen mit den synovialen und periligamentären Gefäße zu den Kreuzbändern. Im Bandgewebe befinden sich vier

verschiedene Klassen von sensorische Nervenendigungen: Ruffini- und Pacini-körperchen, Golgi Apparate und freie Nervenendigungen. Die Ruffini Körperchen übernehmen dabei die Funktion eines statischen und dynamischen Mechanorezeptors, welcher in der Lage ist, die statische Knieposition, intraartikulären Druck sowie Ausmaß und Geschwindigkeit von Bewegungen des Gelenkes zu erfassen. Paccini Körperchen geben Aufschluß über Beschleunigung und Verlangsamung bei Bewegungen des Gelenkes, in Ruhe haben sie keine Funktion. Den Spannungszustandes der Kreuzbänder wird von den Golgi-Apparaten erfaßt. Auch diese Rezeptoren haben in Ruhe keine Funktion. Die freien Nervenendigungen fungieren als reine Schmerzrezeptoren. Die Innervation des VKB spielt eine große Rolle beim Schutz vor unphysiologischen Bewegungen. Durch neuronale Rückkopplungsmechanismen vor allem auf spinaler Ebene (γ -Motorneuron) steuern sie die Kontraktion der knieumgebenden Muskulatur und damit die Gelenkführung und –stabilität **(51,62)**.

1.5 Transplantatremodeling

Bereits 1905 wurde von Wilhelm Roux **(96)** die Theorie der funktionellen Adaptierung eines Organs in Folge einer quantitativen oder qualitativen Funktionsänderung beschrieben.

Amiel et al **(7)** zeigten 1986 in histologischen Untersuchungen zum Ablauf des Heilungsprozesses nach VKB Ersatz am Kaninchen, eine Metamorphose der verwendeten Sehnen transplantate zu einem Ersatzgewebe gemäß dem vorderen Kreuzband, im Sinne einer funktionellen Adaptierung an die neue Umgebung. Dieser Prozeß der Ligamentisierung oder Remodeling der Sehnen transplantate gilt auch heute noch als biologische Basis **(7,24)**. In Anlehnung an die Beobachtungen von Amiel definierte Bosch 1993 verschiedene fließend ineinander übergehende Heilungsphasen des Transplantates nach Kreuzbandersatz **(25)**. Er unterteilte den Umbauprozess des Transplantates in grundsätzlich drei verschiedene Abschnitte:

1.5.1 Initiale Phase (Nekrose und Degradation)

Unmittelbar postoperativ wird die Festigkeit der Kreuzbandplastik durch die initiale Verankerung bestimmt. Das freie, also avaskuläre Sehnen transplantat durchläuft nun

eine Phase in der partiell ischämische Nekrosen und Degradation des kollagenen Bindegewebes die mechanischen Eigenschaften und die Festigkeit des VKB-Ersatzes zunehmend mindern. Makroskopisch findet man periphere Zonen mit einwachsendem hyperzellulärem und hypervaskulären Bindegewebe neben zentralen avaskulären Nekrosezonen. Auch ultrastrukturell lassen sich diese degenerativen Veränderungen, anhand von Mitochondrienschwellung, Veränderungen des endoplasmatischen Retikulums, sowie intrazellulärer Lipideinschlüsse und Desintegration der Kollagenfibrillen, nachweisen.

1.5.2 Revitalisierungsphase (Reparation und Proliferation)

Diese Phase wird durch eine sukzessiv voranschreitende Revaskularisierung von peripher nach zentral charakterisiert. Das avitale Transplantat wird durch zell- und gefäßreiches Bindegewebe ersetzt. Die Zunahme des Kollagengehaltes vom Typ III mit einem wesentlich geringeren mittleren Fibrillendurchmesser, sowie der Anstieg des Fibronektin- (Zellmigration und –Adhäsion an die EZM) und Glycosaminoglykan (GAG)-Gehalts, sind Ausdruck der reparativ-proliferativen Prozesse. In dieser Phase verliert das Gewebe seine straffe Organisation der Extrazellulärmatrix und damit weiter an mechanischer Festigkeit. 8 Wochen postoperativ läßt sich biomechanisch die geringste Zugfestigkeit und Elastizität des VKB-Ersatzes feststellen.

1.5.3 Remodelingphase (bis zu 2 Jahren)

Bis zur 24. Woche postoperativ organisiert sich die EZM zunehmend. Dies äußert sich in der Abnahme und Normalisierung des Zellgehaltes und einem rückläufigen Gehalt von Kollagen Typ III und Fibronektin. Der mittlere Kollagenfibrillendurchmesser ändert sich jedoch nicht wesentlich und es dominieren weiterhin hauptsächlich dünne Fibrillen (bis 100 nm).

1.6 Revaskularisierung von Kreuzbandtransplantaten

Die endoligamentäre Revaskularisierung eines freien Sehnen transplantates nach vorderem Kreuzbandersatz ist eine notwendige biologische Voraussetzung der Ligamentisierung und Gewährleistung der Langzeitüberlebensdauer des Transplantates **(4,11,32)**. Im Gegensatz zum nativen vorderen Kreuzband wird das Transplantat von keiner gut vaskularisierte synovialen Oberfläche umhüllt und besitzt keinerlei Blutversorgung. Wie erwähnt durchläuft der Bandersatz während des Einheilungsprozesses 3 verschiedene Phasen, wobei es über eine Phase der initialen Degeneration zum Einwachsen von hyperzellulärem und hypervaskulärem Granulationsgewebe kommt, bis das Transplantat nach bis zu 2 Jahren seine originäre Festigkeit wiedererlangt **(25)**. Durch die einwachsenden Kapillaren wird die notwendige Sauerstoff- und Nährstoffversorgung gewährleistet und damit der Heilungsprozeß entscheidend unterstützt und getriggert.

Die Revaskularisierung von Kreuzbandtransplantaten wurde in der Vergangenheit intensiv in verschiedenen Studien untersucht **(4,7,11,12,32,67,104)**.

Arnoczky und Co-Autoren **(11)** berichten in einer Untersuchung am Hund von einem nach 20 Wochen mit reichlichen Kapillaren durchsetzten Patellarsehnen transplantat nach vorderem Kreuzbandersatz. In dieser Studie wurde eine dem nativen vorderen Kreuzband vergleichbarer Gefäßstatus nach 12 Monaten erreicht. Laser Dopplerflowmetrie gestützte Untersuchungen **(104)** von humanen autologen Kreuzbandtransplantaten zeigten ebenfalls die späte Wiedererlangung der Gefäßdichte entsprechend dem nativen VKB nach 12 Monaten.

Im Gegensatz dazu wird in anderen Studien von einer unveränderten Hypovaskularität des Transplantats noch 8 Wochen postoperativ berichtet, wesentliche Änderung der Gefäßverteilung nach 6 und 12 Monaten konnten nicht festgestellt werden **(32)**.

Diese kontroversen Aussagen lassen sich durch zum Teil unterschiedliche Studiendesigns und unterschiedliche Techniken der Gefäßdarstellung erklären.

Bislang wurden hauptsächlich die Spalteholztechnik **(10,11)** und die Tuscheinjektion **(11,17,32)** verwendet, aber auch mikroangiographische Verfahren **(10)** und die Laser-Dopplerflowmetrie **(104)** kamen zum Einsatz.

Diese Techniken ermöglichen jedoch nur Aussagen über direkt unter der Oberfläche liegende Gefäße (Laser-Dopplerflowmetrie) oder vermögen es nur Gefäße bis zur

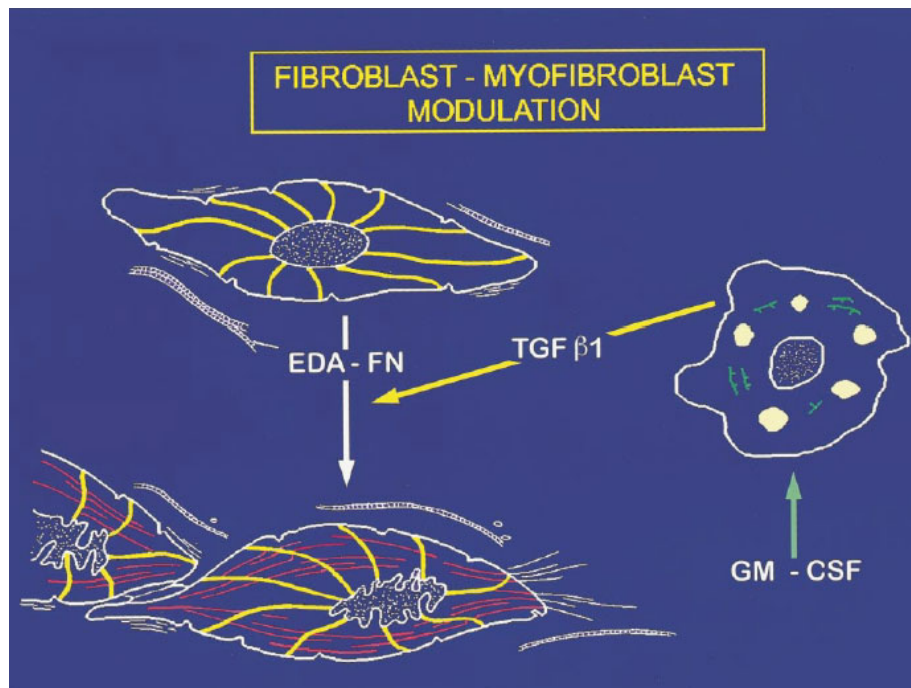
Größe einer Venole oder Arteriole sicher nachzuweisen. Das endoligamentäre Kapillarnetz kann jedoch nicht präzise dargestellt werden **(32,104)**.

Somit ist nicht sicher, ob die Transplantatrevaskularisierung und die Wiederherstellung des originären Gefäßstatus, entsprechend dem nativen VKB, nicht bereits früher als bisher nachgewiesen erreicht wird.

1.7 Myofibroblasten (MFB)

Im Rahmen des Remodelingprozesses wird das alte Kollagengewebe des Transplantates als Leitstruktur für das einwachsende Granulationsgewebe genutzt. Mit Beginn der Revaskularisierung und Rezellularisierung wird das alte Kollagengerüst des Transplantates durch Fibroblasten abgebaut und sukzessive durch neugebildetes Kollagen ersetzt. Dabei kommt es zur Umwandlung bzw. Modulation von Fibroblasten zu sogenannten Myofibroblasten. Die Myofibroblastenmodulation erfolgt durch ein komplexes Zusammenspiel von Mediatoren, in dem Wachstumsfaktoren, Zytokine, Adhaesionsmoleküle und Komponenten der Extrazellulärmatrix eine Rolle spielen **(103)**.

Abbildung 5: Modell der Fibroblasten-Myofibroblasten Modulation: TGF β 1 wird von Thrombozyten (nicht abgebildet) und Makrophagen freigesetzt. Ursächlich dafür vermutet man die Stimulation dieser Zellen durch GM-CSF. Freigesetztes TGF β 1 aktiviert stromaständige Fibroblasten zur Synthese und Organisation eines dreidimensionalen ECM-Gerüsts, das Fibronectin enthält. Gemeinsam mit TGF β 1 vermag es die Induktion des myofibroblastischen Phänotypen. (TGF β 1 = transformed growth factor β 1; GM-CSF = germcell-colonie stimulating factor; ECM = extracellular matrix; ED-A FN = Fibronectin)



Myofibroblasten sind hochdifferenzierte Zellen die sowohl Eigenschaften glatter Muskelzellen (Kontraktionsfähigkeit) als auch Fibroblasten (Kollagenproduktion) in sich vereinigen **(40)**.

Myofibroblasten enthalten eine Isoform des kontraktilen Proteins Aktin, das α - smooth muscle Aktin (ASMA). Aktin ist ein weitverbreitetes Zytoskelett-Protein, das bei Vorgängen wie Phagozytose, Zellmigration und Kontraktion eine wichtige Rolle spielt. Es treten 6 Isoformen auf, die von verschiedenen Genen kodiert werden und sich in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden: Die sogenannten „non-muscle-Aktin-Isoformen, β - und γ -cytoplasmatic-actin, treten im Zytoplasma nahezu aller Zellen auf. Weiterhin existieren 4 muscle-Aktin-Isoformen, die je nach Zelltyp spezifisch sind und so eine Differenzierung verschiedener Muskelzellen ermöglichen. Dies sind α -skeletal Aktin, α -cardiac Aktin, sowie die charakteristischerweise in glatten Muskelzellen auftretenden Isoformen α - smooth muscle Aktin (ASMA) und γ - smooth muscle Aktin **(55,116,117)**. Die Aktinfilamente der Myofibroblasten sind in sogenannten “stress fibers” gebündelt, die parallel zur Zellängsachse verlaufen und hauptsächlich entlang der Zellmembran zu finden sind. Die ASMA-Isoform wurde sowohl in glatten Muskelzellen als auch in Perizyten und im kontraktilen Apparat fibroblastenähnlicher Myofibroblasten entdeckt und gilt als Marker dieser Zellen **(106)**.

Myofibroblasten zeichnen sich durch ausgeprägte interzelluläre Verbindungen und hoch entwickelte Zell-zu-Stroma Verbindungen (Fibronexus) aus, die es diesem Zelltyp ermöglichen, Zugkräfte auf die ihn umgebende Extrazellulärmatrix auszuüben **(16,99,103)**.

Als Ursprung der Myofibroblasten werden neben den Fibroblasten auch glatte Gefäßmuskelzellen, Perizyten und diverse Stromazellen mit myoidem Charakter vermutet. Nach wie vor ist es fraglich, ob nur spezielle Subtypen von Fibroblasten der Modulation zu Myofibroblasten unterliegen, oder alle Fibroblasten diese Fähigkeit besitzen **(99)**. In vitro Studien zeigten, daß Myofibroblasten vornehmlich isometrische Zugkräfte ausüben. Es ist anzunehmen, daß in vivo bei der Kontraktion von granulierendem oder fibrosierendem Gewebe ähnliche Prozesse stattfinden **(52)**.

1971 wurden Myofibroblasten erstmalig von Gabbiani et al **(48)** während der Wundheilung im Granulationsgewebe, als Zelle mit ultrastrukturellen Eigenschaften zwischen Fibroblast und glatter Muskelzellen beschrieben. Ihr wurde eine wichtige Rolle im Mechanismus der Wundkontraktion zugeschrieben. In der Folgezeit entdeckte man

diesen Zelltyp bei vielen pathologischen Umbauprozessen die mit Gewebeuntergang und -erneuerung einhergehen.

So wurden Myofibroblasten als pathognomonisches Korrelat der Dupuytren'schen Kontraktur entdeckt **(47)**, sowie bei der Leberzirrhose **(18)** Nieren- **(81)** und Lungenfibrose **(2)** und in metaplastischen Stromaveränderungen als Reaktion auf Neoplasien **(101)** nachgewiesen.

Faryniarz et al **(40)** wiesen Myofibroblasten 1996 erstmals im nativen und heilenden Gewebe des medialen Kollateralbandes am Knie des Kaninchen nach. In dieser Studie wurde vermutet, daß die vorübergehend erscheinenden Myofibroblasten eine Rolle bei der Gewebekontraktion spielt und so zur Wiedererlangung der in-situ Spannung des heilenden Bandes führt. Wenig später wurde dieser Zelltyp im intakten **(80)** und rupturierten **(79)** humanen vorderen Kreuzband nachgewiesen. Murray und Spector **(80)** vermuteten das die kontraktile Eigenschaft dieser Zellen für das Zusammenziehen der Extrazellulärmatrix und die Ausbildung der Kollagentertärstruktur, dem sogenannten Kollagen-Crimp, verantwortlich ist. Somit seien kontraktile Myofibroblasten ein fester Bestandteil des intakten vorderen Kreuzbandes.

1.8 Ziel der Untersuchung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zwei Teilaspekte des Remodellingprozeß, die Revaskularisierung und Ligamentisierung eines freien Sehnentransplantates nach VKB-Ersatz weiter aufzuklären:

1.: In der Literatur wird allgemein von einer beginnende Revaskularisierung nach 2-4 Wochen ausgegangen. Ein Gefäßstatus entsprechend dem nativen vorderen Kreuzbandes wird nach ca. 12 Monaten erreicht. Bisherige Studien sind aufgrund verschiedener Studienmodelle und verschiedener Nachweismethoden jedoch schwer vergleichbar. Die verwandten Nachweismethoden sind nach meiner Ansicht auch nicht in der Lage das feine endoligamentäre Gefäßnetz der Kreuzbandtransplantate darzustellen. Bei der Dopplerflowmetrie können, in Abhängigkeit von der verwendeten Meßsonde, nur direkt unter der Oberfläche liegende Gefäße detektiert werden. Gefäße, die tiefer als 250 µm unter der Oberfläche liegenden, können nicht erfaßt werden **(60)**. Bei anderen Nachweismethoden wie der Spalteholztechnik oder radiographischen Methoden werden aufgrund der Partikelgröße der verwendeten Markersubstanzen nicht

alle Kapillaren perfundiert. Somit ergibt sich eventuell ein falsches Bild der Revaskularisierung, die bereits früher und mit einer anderen Kinetik als bisher beschrieben ablaufen könnte.

Die in der vorliegenden Arbeit angewendete immunhistologische Methode der Gefäßdarstellung im remodellierenden Transplantat ist unabhängig von den Einschränkungen bisheriger Nachweismethoden **(115)**. Somit kann die Kinetik und der Ablauf der endoligamentären Revaskularisierung neu beurteilt werden.

Wir vermuten eine wesentlich früheres Erreichen des Gefäßstatus des nativen VKB.

2.: Im Rahmen der Wundheilung, sowie bei fibrotischen oder metaplastischen Gewebeveränderungen konnten hochdifferenzierte Fibroblasten, sogenannte Myofibroblasten, nachgewiesen werden, die es vermögen Zugkräfte auf die sie umgebende Extrazellulärmatrix auszuüben. Am Bewegungsapparat wurde dieser Zelltyp bislang im heilenden Kollateralband des Kniegelenkes **(40)** und als fester Bestandteil des intakten VKB **(80)** beschrieben. Die Autoren dieser Arbeiten hypothetisierten, daß Myofibroblasten eine Rolle bei der Gewebekontraktion spielen und so zur Wiedererlangung der in-situ Spannung des heilenden Bandes führen. Weiterhin wurde vermutet, daß die kontraktile Eigenschaften dieser Zellen für das Zusammenziehen der Extrazellulärmatrix und die Ausbildung der Kollagentertärstruktur, dem sogenannten Kollagen-Crimp, verantwortlich sind. Über die Repopulation von Myofibroblasten eines remodelierenden VKB-Transplantates lassen sich in der Literatur bislang keine Angaben finden. Es läßt sich vermuten, daß bei den reparativen Ab- und Aufbauvorgängen der Kollagenmatrix eines VKB-Transplantates, Myofibroblasten ebenfalls eine entscheidende Rolle spielen. In der vorliegenden Studie soll mittels immunhistologischer Färbemethode untersucht werden, ob der spezielle Zelltyp der Myofibroblasten im remodelierenden VKB wieder auftritt und seine Funktion weiter aufgeklärt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Studiendesign

In der vorliegenden Studie wurde am linken Kniegelenk von 36 ausgewachsenen weiblichen Merinoschafen eine offene vordere Kreuzbandersatzplastik vorgenommen. Als Transplantat diente ein freies Sehnentransplantat des Musculus flexor digitorum superficialis. Das Transplantat wurde femoral und tibial mit einer biodegradierbaren poly-(D,L-lactid) (PDLLA) Interferenzschraube auf Höhe des Gelenkspaltes fixiert. Postoperativ wurden nach standardisierten Protokollen Röntgenverlaufskontrollen und in-vivo Fluoreszenzmarkierungen vorgenommen. Die Tiere wurden 2-3 Tage vor und bis zu jeweils 8 Tagen nach dem operativen Eingriff in unserer tierexperimentellen Einrichtung untergebracht. Die übrige Zeit waren die Tiere auf einem Außengelände der Charité in einem Stall mit freier Auslaufmöglichkeit untergebracht. Vor der Tötung erfolgte eine MRT Untersuchung des operierten Kniegelenkes. Nach der Explantation wurden die Kreuzbandrekonstruktionen biomechanisch getestet. Abschließend wurden die hier im weiteren vorgestellten histologischen Untersuchungen durchgeführt. Von meinen Mitdoktoranden wurden spezielle Fragestellungen zur Biomechanik der Kreuzbandrekonstruktion, zum Degradationsverhalten des PDLLA-Interferenzschraubenimplantats, zum Ablauf der Knochen-Sehnen-Heilung **(120)** und der Aussagekraft der MRT bezüglich der Transplantateinheilung **(122)** untersucht.

Die Studie wurde mit Genehmigung der staatlichen Tierversuchskommission durchgeführt und durch Mittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert. Während des gesamten Versuchszeitraumes befanden sich die Tiere unter tierärztlicher und tierpflegerischer Kontrolle der tierexperimentellen Abteilung der Charité/ Campus-Virchow.

2.2 Tiermodell und Standzeiten

Um eine möglichst große klinische Relevanz unserer Untersuchungen zu gewährleisten, mußte ein Großtiermodell gewählt werden. Das Schaf eignet sich aufgrund seiner Größe ideal als Versuchstier und wurde von vielen Arbeitsgruppen aus dem Gebiet der Kreuzbandchirurgie bereits erfolgreich verwendet **(93,127)**.

Für den Tierversuch wurden weibliche Merinoschafe mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 51,4 (± 8,7) kg verwendet. Diese wurden über einen eingetragenen Züchter bezogen. Um eine Beeinflussung der Transplantateinheilung durch eine noch aktive Wachstumsfuge auszuschließen, wurden die Tiere vor Versuchsbeginn geröntgt und entsprechend selektiert.

Abbildung 6: Versuchstiere in der tierexperimentellen Abteilung der Humboldt-Universität zu Berlin, Charité, Campus Virchow.



Im Vergleich zum Menschen besitzen Schafe nur sehr dünne und flächige Hamstringsehnen, die zur Rekonstruktion des VKB nicht geeignet sind. Daher wurde als Transplantat die Sehne des ipsilateralen Musculus flexor digitorum superficialis verwendet (Hunt et al, nicht publizierte Daten).

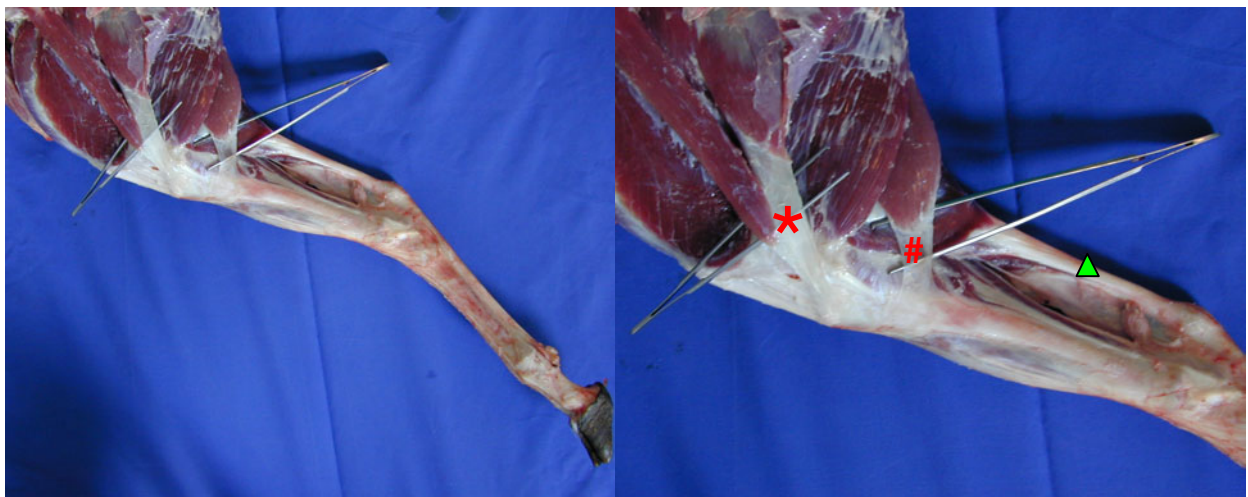


Abbildung 7: Anatomische Studie am Hinterlauf des Schafes. Markiert sind die sich beim Schaf nur sehr dünn und flächig darstellenden Sehnenanteile der Mm. semitendinosus und gracilis (*), sowie M. semimembranosus (#). In der Studie wurde daher die Sehne des M. flexor digitorum superficialis verwendet, die von der Achillessehne (▲) umhüllt wird.

Die Schafe wurden in sechs Gruppen à sechs Tieren aufgeteilt. Es wurden postoperative Standzeiten von 6, 9, 12, 24, 52 und 104 Wochen festgelegt.

Aus der Literatur und Arbeiten anderer Projektgruppen ist bekannt, daß das Transplantatremodelling und die Transplantateinheilung nach 24 Wochen weitgehend abgeschlossen ist. Hinsichtlich eines in der Praxis immer wieder geforderten frühzeitigsten Beginn von physiotherapeutischen Übungsbehandlungen, war für uns von Interesse, Daten über die biomechanische Belastbarkeit und die dazu korrelierenden biologischen Umbauprozesse des Transplantats in der frühen Einheilungsphase nach VKB-Ersatz zu erhalten. Dazu wurden biomechanische Testungen zur Ermittlung der Bandlaxizität und Ausrißfestigkeit durchgeführt. Die Standzeiten von 52 und 104 Wochen sollten Aufschluß darüber geben, ob in dieser späten Phase noch Umbauprozesse im Sinne eines späten Remodellings im Transplantat stattfinden.

	Anzahl der Tiere	Bio- mechanische Testungen	Knochen- Band- Heilung	Band- heilung	Schrauben- degradation
Kontrollgruppen					
natives VKB	(-)			9	
Flexorsehne	(-)			6	
Standzeiten					
6 Wochen	6	6	6	5	6
9 Wochen	6	6	6	5	6
12 Wochen	6	6	6	5	6
26 Wochen	6	6	6	5	6
52 Wochen	6	5	5	5	5
104 Wochen	6	6	6	5	6

Tabelle 1: Übersicht der verschiedenen Versuchsgruppen und ihre Standzeiten, sowie die vorgenommenen Untersuchungen (natives VKB und die Flexorsehne wurden randomisiert von der nicht operierten Gegenseite entnommen)

2.3 Operatives Vorgehen

2.3.1 Prämedikation, Narkose und Analgesie

Zur Sedierung wurden über eine in die V. jugularis externa eingebrachte Venenverweilkanüle¹ zunächst 1000 mg Thiopental² (aufgelöst in 20 ml Aqua dest.) verabreicht. Nun wurden die Tiere an beiden Hinterläufen von der Hüfte bis kurz über den Huf rasiert und gereinigt. Mit einer Ohrmarke wurden die Tiere zur Gruppenteilung markiert. Anschließend wurden die Tiere an beiden Vorderläufen sowie dem rechten Hinterlauf auf dem OP- Tisch in rechter Seitenlage fixiert. Zum intraoperativen Monitoring wurde den sedierten Tieren drei EKG- Elektroden auf der Brusthaut festgenäht.

Nach erneuter Gabe von ca. 1000 mg Thiopental (aufgelöst in 20 ml Aqua dest.) konnten die Tiere mit Hilfe eines Laryngoskop mit langem geradem Spatel (nach Foregger) und einem Oxford-Tubus, Größe 8.0, intubiert werden. Zuletzt wurde ein Magenkatheter gelegt.

Die Tiere wurden intraoperativ durch einen Narkosegerät³ mit einem durchschnittlich Minutenvolumen von 7 Litern beatmet. Zugeführt wurde ein Gemisch aus Stickoxydul und Sauerstoff im Verhältnis 3 : 2 und 1-2% Isoflurananteil. Während der Operation erhielten die Tiere über den zentralen Zugang isotonische Kochsalzlösung infundiert. Zur Antibioseprophylaxe wurden 2,2 g Augmentan®⁴ als Einmalgabe verabreicht. Zur Schmerzprophylaxe bekamen die Tiere postoperativ ein Gemisch aus 1250 mg Novaminsulfon⁵ und 50 mg Tramadol⁶ über drei Tage intramuskulär injiziert.

¹ Venflon 2®, BOC Ohmeda AB, Helsingborg Schweden

² Trapanal® Byk Gulden Lomberg Chem. Fabrik GmbH, Konstanz, Deutschland

³ Servo Ventilator 900 D, Siemens-Elema, Schweden

⁴ SmithKline Beecham Pharma GmbH, München, Deutschland

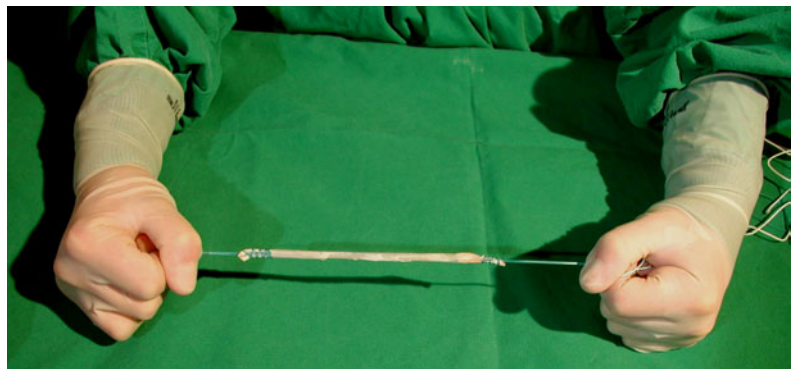
⁵ Novaminsulfon-ratiopharm® 2,5 Injektionslösung, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland

⁶ Tramal® 100 Injektionslösung, Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland

2.3.2 Operative Phase

Das operative Vorgehen erfolgte nach herkömmlichen sterilen Regeln. Nach sterilem Abwaschen mit Polyvidonjodlösung⁷ und Abdecken des linken Hinterlaufes wurde zunächst das Flexorsehnenransplantat gewonnen. Über einen longitudinalen Hautschnitt am linken Hinterlauf wurden die bindegewebigen Verschiebeschichten bis auf die Sehne des M. flexor digitorum longus durchtrennt. Diese umschließt die Sehne des M. flexor digitorum superficialis mantelförmig. Die Sehne des M. flexor digitorum longus wurde der Länge nach durchtrennt und das Transplantat nun unter Zuhilfenahme von zwei Overholt-Zangen mobilisiert. Nun wurde ein 7 - 9 cm langes und 0,5 - 0,8 cm breites Stück aus ihr scharf herausgetrennt, so daß stets ein Teil der ursprünglichen Sehne intakt blieb. Abschließend wurde die Wunde schichtweise mit Vicryl® 3/0 und Ethilon II ® 3/0 wieder verschlossen. In jedes Ende des gewonnenen Transplantats wurde mit einer 1,5 - fachen Kirchheim-Kessler Sehnennaht ein kräftiger Haltefaden aus Vicryl CT® 1/0 Faden geschlungen und dieser auf seine Ausrißfestigkeit geprüft. Das fertig präparierte Transplantat wurde dann in einer mit physiologischer Kochsalzlösung getränkten Mullkompressen feucht gehalten.

Abbildung 8: Prüfung der Ausrißfestigkeit der eingebrachten 1,5 fachen Kirchheim-Kessler Sehnennaht.



2.3.3 Kreuzbandersatz

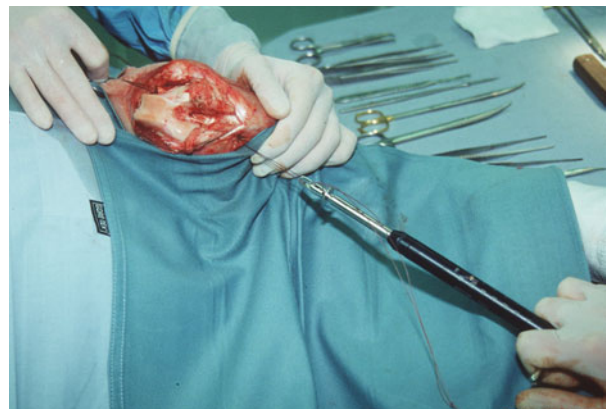
Über einen 12 - 15 cm langen Hautschnitt medial des Lig. Patellae wurde nach Durchtrennung der Verschiebeschichten und Einkerbung des M. vastus medialis die Gelenkkapsel eröffnet. Anschließend konnte die Patella nach lateral luxiert werden und der Gelenkraum dargestellt werden. Der Hoffa'sche Fettkörper wurde dabei unter Erhaltung des Lig. transversum genus durchtrennt. Nun wurde das vordere Kreuzband

⁷ Braunol 2000, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

herausgetrennt und die Insertionsstellen mit dem scharfen Löffel debridiert. Um ein späteres Impingement des Transplantates an der lateralen Notchwange zu vermeiden, wurde hier die Fossa intercondylaris (Notch) mit einem kleinen (5 mm) Meißel erweitert.

Zur Verankerung des Transplantates wurden femoral und tibial, jeweils im Bereich der alten Bandansätze, 3,5 mm große bikortikale Bohrkanäle gebohrt. Anschließend wurde femoral auf 6 mm, bis 25 mm tief, aufgebohrt. Tibial wurde der Bohrkanal komplett bis durch die Gegenkortikalis auf 6 mm aufgebohrt. Nach Aufweitung der Bohrlöcher mit einem 7 mm großen Dilatator zur Verdichtung der Spongiosa und Entgratung mit einer groben Feile, wurde jetzt das Transplantat mit Hilfe eines Ösendrahtes über seine Haltefäden in die Bohrkanäle eingefädelt und durch die Haut ausgeführt. Zur Streckung der Sehnenfibrillen wurde das Transplantat in-situ mit 60 Nm für ca. 1 min. vorgespannt **(113)**.

Abbildung 9: Vorspannung des Transplantates mit 60 Nm für ca. für 1 min.



Danach wurde es unter Zugspannung zunächst femoral, dann tibial mit je einer 8 x 23mm großen bioresorbierbaren Interferenzschraube (Sysorb®⁸) verankert. Nach dem Entfernen der Haltefäden erfolgte der Kapselverschluß mit Vicryl® SH 1/0⁹ und der schichtweise Wundverschluß.

⁸ Sulzer Orthopedics Ltd., Baar, Schweiz

⁹ Ethicon, Norderstedt, Deutschland

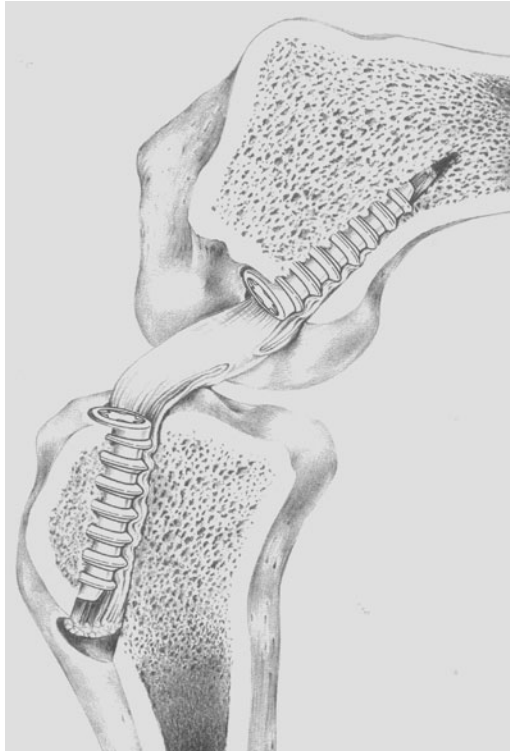


Abbildung 10: Schematische Darstellung des VKB-Ersatzes mittels Flexorsehne und Verankerung mit resorbierbaren Interferenzschrauben auf Gelenkniveau (aus Weiler et al. 2002 (121))

2.4 Explantation

Nach 6, 9, 12, 24, 52 und 104 Wochen wurden jeweils 6 Schafe getötet. Dazu wurde den Tieren eine Venenverweilkanüle in die V. jugularis externa gelegt und zunächst 0,5 ml Thiopental (1000 mg Thiopental aufgelöst in 20 ml aqua dest.) zur Sedierung verabreicht. Nach Applikation von 40-60 ml Kaliumchlorid¹⁰ trat der Tod durch Herzstillstand ein.

Anschließend wurden beide Kniegelenke in toto explantiert. Nach sterilem Abpunktieren der Synovialflüssigkeit wurde die Kniegelenkscapsel eröffnet. Der Binnenraum wurde makroskopisch hinsichtlich Entzündungszeichen (Gefäßinjektionen der Synovialis, Gelenkergußbildung und Synovialhyperthrophie), sowie der Ausbildung einer neuen synovialen Hüllschicht um das Transplantat beurteilt und photographisch dokumentiert. Für etwaige sich später stellende Fragestellungen bezüglich entzündlicher Reaktion auf das bioresorbierbare Implantat wurden routinemäßig Synoviaabstriche angefertigt, die inguinalen Lymphknoten sowie Synovialisproben entnommen.

¹⁰ Kaliumchlorid 7,45% Braun, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Nun wurden die Kniegelenke nach entsprechender Präparation und Einbettung der femoralen und tibialen Knochenenden in einer Materialtestmaschine (Zwick UPM 1455¹¹) biomechanisch getestet. Es wurde die anterior-posteriore Translation im Schubladentest sowie die Ausrißfestigkeit des Kreuzbandersatzes ermittelt (**121**). Nach der biomechanischen Testung wurde das vordere Kreuzband scharf reseziert. In den Gruppen mit kurzer Standzeit (6 und 9 Wochen) kam es beim Ausreistest zu einem intraligamentären Versagen des Kreuzbandersatzes, sodaß nur 5 Tiere pro Gruppe ausgewertet werden konnten. Durch den weiteren Verlust eines Tieres in der 52 Wochen Gruppe wurden in die spätere histologische Auswertung aus jeder Gruppe auch nur je 5 Tiere in die histologische Auswertung übernommen (siehe auch Tabelle 1). Weiterhin wurden als Kontrollgruppen randomisiert insgesamt 9 native vordere Kreuzbänder, sowie 6 Flexorsehnen der nicht operierten Gegenseite als Transplantat zum Zeitpunkt Null entnommen.

2.5 Histologische Aufarbeitung

Zur Herstellung von histologischen Präparaten wurde das bei der Explantation entnommene Gewebe zunächst für mindestens 48 Stunden in 5% Formalinlösung¹² fixiert. Anschließend wurden Proben des mittleren Drittels in längs und quer zum Faserverlauf geschnittene Portionen geteilt und über 18 Stunden lang automatisch entwässert¹³. Zuletzt wurde das Gewebe in Paraffin¹⁴ eingebettet und mit einem Mikrotom¹⁵ 3-4 µm dünne Serienschnitte angefertigt. Diese wurden für die konventionelle Lichtmikroskopie auf unbehandelte, für die immunhistologischen Färbungen auf silanisierte¹⁶ Objektträger¹⁷ aufgezogen.

¹¹ Materialprüfmaschine Zwick 1455, Ulm, Deutschland

¹² Formaldehyd, E. Merck 64271 Darmstadt

¹³ Hi-Tec® Gewebeeinbettautomat "1500" Typ DDm-P800, 35418 Busek

¹⁴ Paraplast Plus® Tissue Embedding Medium, Sherwood Medical Co. St. Louis, Mo USA

¹⁵ Leica RM 2035, Leica Instruments GmbH 69226 Nußloch

¹⁶ (3-Aminopropyltriethoxysilan, Sigma-Aldrich® Chemie GmbH 82041 Deisenhofen)

¹⁷ (Super Frost®, Menzel-Gläser Deutschland)

2.6 Konventionelle Färbungen

Als Übersichtsfärbungen wurden die Färbung mit Haematoxylin¹⁸ und Eosin¹⁹ (H&E), sowie die Trichromfärbung nach Masson-Goldner gewählt. Mit Hilfe der H&E Färbung lassen sich Zellen differenziert darstellen und unterscheiden. Die Masson-Goldner Trichromfärbung ermöglicht die Beurteilung der Extrazellulärmatrix und die Differenzierung von Kollagenfibrillen und Epithelgewebe (hier: synoviale Oberfläche).

2.7 Immunhistologie

2.7.1 Theorie der Immunhistologie

Immunhistochemische Färbemethoden ermöglichen es antigene Strukturen (Epitope) von Zellen und Gewebsabschnitten durch spezifische Antikörper nachzuweisen und zu identifizieren.

In der Immunhistochemie werden fast ausschließlich IgG und IgM verwendet. Seit der ersten Verwendung fluoreszenzfarbstoffmarkierter Antikörper durch Coons 1941 **(33)** wurde die Sensitivität und Spezifität immer weiter verbessert. Heute werden spezifische Antikörper eingesetzt, die durch Isotope, partikuläres Material (z.B. Erythrozyten), Fluoreszenzfarbstoffe oder Enzyme markiert sind und so dargestellt werden können. Als wesentliche Voraussetzung für die Wertigkeit der Methoden und Untersuchungen sind die Spezifität der verwendeten Antikörper für das zu markierende Antigen, sowie die Stabilität der nachzuweisenden antigenen Strukturen. Diese hängt sowohl von der chemischen Natur des Antigens, als auch von der Vorbehandlung (Fixierung, Einbettmedium, Färbeprotokoll) ab. Grundsätzlich unterscheidet man polyklonale und monoklonale Antikörper **(21,36)**.

¹⁸ (Harris Haemalaun)

¹⁹ (Eosin Y Solution Aqueous, Sigma Diagnostics St.Louis Missouri 63178 USA)

Polyklonale Antikörper

Polyklonale Antikörperpräparationen entstammen von verschiedenen B-Lymphozyten (Plasmazellen) und sind somit heterogen (bezüglich ihres Antigen-Bindungsspektrums). Sie reagieren mit verschiedenen Epitopen des Antigens gegen das sie gebildet wurden. Somit wird die Sensitivität und Reaktivität der Färbemethode erhöht, da mehrere Bindungsstellen des Antigens erkannt und besetzt werden. Sie haben jedoch den Nachteil, durch Kreuzreaktionen mit ähnlichen antigenen Determinanten, falsch positive Ergebnisse zu erzeugen.

Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörperpräparationen stammen von einem einzigen B-Zell-Klon. Diese Zellklone werden durch Fusion einer antigenspezifischen Plasmazelle und einer nicht-sekretorischen Myelomzelle gewonnen. Die B-Lymphozyten sind in der Lage spezifische Antikörper zu produzieren, während die Myelomzellen für die Stabilität, Langlebigkeit und Kultivierbarkeit des Hybrids sorgen. Durch klonale Vermehrung können theoretisch unendlich viele Antikörper produziert werden. Alle Antikörper eines Plasmazellklons sind immunchemisch identisch, homogen und reagieren nur gegen ein spezifisches Epitop des Antigens, gegen das sie produziert wurden. Somit haben monoklonale Antikörper eine sehr hohe Antigen-Spezifität. Bei zerstörter oder strukturell veränderter antigenen Determinante (durch die Präparation: Temperatur, pH-Wert, Fixierung, usw.) kann es jedoch zu falsch negativen Ergebnissen kommen und damit zu einer verminderten Sensitivität der monoklonalen Antikörper.

2.8 Immunhistochemische Färbungen

Alle Serienschnitte für die immunhistochemischen Färbungen wurden zunächst in Xylol entparaffiniert, in der absteigenden Alkoholreihe hydriert und in Pufferlösung²⁰ feucht

²⁰ Tris-Puffer TBS, Herstellung siehe Anhang

gehalten. Eine unspezifische Hintergrundfärbung wurde durch eine 20 minütige Applikation von equinem Normalserum²¹ bei Raumtemperatur weitgehend unterdrückt.

2.8.1 Immunhistologische Darstellung der Revaskularisierung

Zur Detektion von Endothelzellen neugebildeter Gefäßkapillaren wurden Querschnitte zunächst nach der Entparaffinierung und Hydrierung mit 0,1% Proteinase-Lösung²² für 10 Minuten bei 37°C vorbehandelt, um die antigenen Epitope zu demaskieren. Anschließend wurde die Schnitte ausgiebig in TBS-Pufferlösung gespült und das Normalserum appliziert. Nach 20 Minuten wurden das Normalserum von den Schnitten abgegossen und ohne zu spülen mit einem polyklonalen F.VIII/ v. Willebrandt-Antikörper²³ in einer Verdünnung von 1:200 bei 4°C über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

2.8.2 Immunhistologische Darstellung der Myofibroblasten

Myofibroblasten (MFB) können aufgrund ihres Gehalts an α -smooth-muscle Aktin, mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers (anti-ASMA-Antikörper²⁴) markiert und immunhistochemisch dargestellt werden. Hierfür wurden ausschließlich Längsschnitte verwendet. Die entparaffinierten und hydrierten Präparate wurden keiner Vorbehandlung unterzogen und konnten direkt nach 20 minütiger Applikation mit Normalserum mit dem anti-ASMA-Antikörper, in einer Verdünnung von 1:20, bei 4°C über Nacht inkubiert werden.

Am Folgetag wurden bei allen Präparaten (F.VIII und ASMA) nach zweimaliger Spülung in TBS-Puffer bei Raumtemperatur für 30 Minuten ein biotinylierter Sekundärantikörper²⁵ aufgetragen. Nach erneutem Waschen in TBS-Puffer, wurde das Gewebe für weitere 50 Minuten mit einem Avidin-Biotin-Komplex²⁶, gekoppelt mit

²¹ (Normal Horse Serum, Vector Lab. Inc., Burlingame, CA, USA)

²² (Protease, Type XIV: Bacterial, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

²³ (Dako Rabbit Anti-Human von Willebrandt Factor, DAKO Glostrup, Dänemark, Kat.-Nr.: A0082)

²⁴ (Mouse anti-human α -smooth-muscle actin monoclonal antibody, Dako A/S, Dänemark, Kat.-Nr.: M0851)

²⁵ (Horse anti-mouse IgG secondary antibody, Vector Lab. Inc., Burlingame, CA, USA)

²⁶ (ABC kit; Vector Lab., Burlingame, CA, USA)

alkalischer Phosphatase als Reporterenzym, inkubiert. Als Substrat diente Neufuchsin²⁷, welches durch die alkalischen Phosphatase zu einem roten Chromogen reduziert wird und somit die markierten Strukturen rot färbt. Die Zellkerne wurden mit Methylgrün²⁸ gegengefärbt, die Präparate entwässert und abschließend mit einem Xylol-löslichen Einschlußmedium²⁹ eingedeckt.

Zur Bestimmung einer unspezifischen Hintergrundfärbung aufgrund unspezifischer Bindungstellen wurden bei allen immunhistochemischen Färbungen Negativ-Kontrollpräparate mit Pufferlösung statt mit Antikörperlösung inkubiert. Alle Inkubationen wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Als Positivkontrollen dienten bei der Färbung mit F.VIII/ v. Willebrandt-Antikörper Präparate von gut vaskularisierter Schafshaut, bei der Färbung mit α -smooth-muscle Aktin-Antikörpern wurden die glatten Gefäßmuskelzellen als interne Positivkontrolle herangezogen.

2.9 Auswertung und Datenanalyse

Für die histologische Befundung wurde auf die Methoden der herkömmlichen Durchlichtmikroskopie und der Polarisationsmikroskopie zurückgegriffen. Alle histologischen Präparate wurden an einem konventionellen Mikroskop³⁰ untersucht. Für die Durchlichtmikroskopie der nach H&E und Masson-Goldner gefärbten Präparate wurden Objektive mit 1,6 x, 2,5 x, 5 x, 10 x, 20 x und 40 x Vergrößerung verwendet. Für die Polarisationsmikroskopie wurden zwei zusätzliche Polarisationsfilter in den Lichtgang zwischengeschaltet. Wegen des hierdurch vermehrt absorbierten Lichtes kamen hier nur Objektive bis zur 20 x Vergrößerung zur Anwendung. Die Dokumentation der histologischen Befunde der Durchlicht- und Polarisationsmikroskopie erfolgte mit einem Belichtungsautomaten³¹ zur automatischen Belichtung von Kleinbildfilmen und über das digitale Bildanalysesystem.

²⁷ (Dako ChemMate, Dako A/S, Dänemark)

²⁸ (Diagnostica Merck, Darmstadt, Deutschland)

²⁹ (Vitro-Clud, R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland)

³⁰ (Leica DMRB Mikroskop, Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, 35530 Wetzlar)

³¹ (Leitz Orthomat E System Wild, Leitz Mikroskope und Systeme GmbH, 6330 Weitzlar)

2.9.1 Konventionelle Lichtmikroskopie

Mit Hilfe der konventionellen Lichtmikroskopie werden die Schnittpräparate nach vorheriger Färbung in verschiedenen Vergrößerungen analysiert. Durch die Anwendung verschiedener Farbstoffe werden die verschiedenen Gewebearten, entsprechend ihrer physikochemischen Eigenschaften, unterschiedlich angefärbt und können voneinander abgegrenzt werden. Hierdurch lassen sich Aussagen über die feingewebliche Zusammensetzung der Präparate treffen.

2.9.1.1 Zellcharakterisierung und morphologisches Erscheinungsbild

Nach oben genannter histologischer Aufarbeitung wurden in je 2 H&E gefärbten Längsschnitten fünf zufällig gewählte Gesichtsfelder bei 200facher Vergrößerung in regelmäßigen Intervallen pro Schnitt evaluiert und die mittlere Zelldichte/ mm² ermittelt. Weiterhin wurde die morphologische Erscheinungsform (spindelförmig, ovoid, rund) der Zellen dokumentiert.

2.9.1.2 Revaskularisierung:

Die immunhistologische Analyse der Revaskularisierung wurde in je 2 Querschnitten der verschiedenen Präparate durchgeführt. Hierzu wurde zunächst in den konventionell gefärbten Schnitten (H&E und Masson-Goldner-Trichrom) die Grenze zwischen der synovialen Oberfläche und dem eigentlichen kollagenen Bandgewebe ermittelt. In folgenden Serienschnitten konnte dann nach immunhistologischer Anfärbung des Gefäßendothels mit anti-v. Willebrandt-Faktor (F. VIII) eine Unterteilung des Querschnittes in eine subsynoviale (unmittelbar angrenzend an die synoviale Deckzellschicht), eine intermediäre und zentrale Schicht erfolgen. Dazu wurde jeweils der Mittelpunkt jedes Querschnittes festgelegt und die Strecke zwischen der Grenzschicht von Synovia und Bandgewebe bis zum Mittelpunkt gedrittelt.

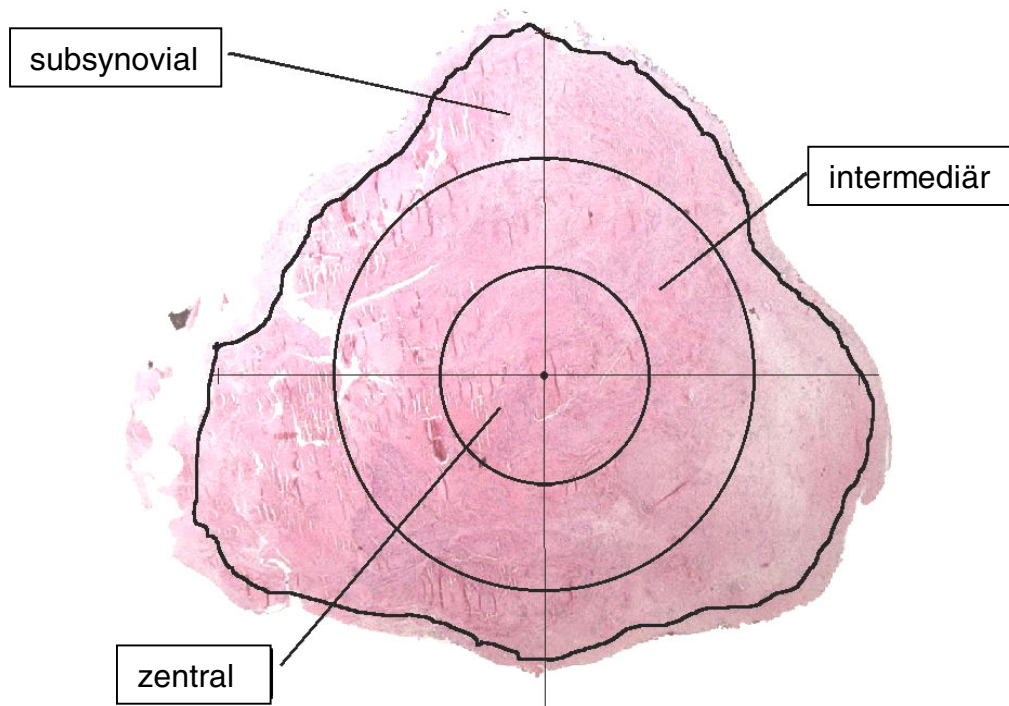


Abbildung 11: Darstellung der Unterteilung der Querschnittpräparate in eine subsynoviale, eine intermediäre und eine zentrale Zone zur Quantifizierung der Gefäßdichte und -verteilung (aus Unterhauser et al 2003 (115)).

In jedem Präparat wurden subsynovial und intermediär fünf, sowie zentral drei repräsentative Gesichtsfelder ausgewählt, die Anzahl von Gefäßquerschnitten pro Gesichtsfeld (je 0.06 mm²) im Zählnetz ermittelt und die mittlere Anzahl an Gefäßquerschnitten/ mm² errechnet. Jeder positiv angefärbte Gefäßanschnitt wurde in die Kalkulation mit einbezogen.

2.9.1.3 Myofibroblasten

Zur immunhistologischen Darstellung ASMA-exprimierender Myofibroblasten wurden ebenfalls je 2 Präparate im Längsschnitt mit anti- α -smooth-muscle Aktin gefärbt und ausgezählt. Jede Zelle mit unklarer Immunreaktivität wurde aus den Zählungen ausgeschlossen. Perizyten und Myofibroblasten wurden aufgrund ihrer morphologischen Erscheinungsform wie Zellform, Lage im Verhältnis zu Gefäßen und ihre Verteilung zwischen den Kollagenfasern voneinander unterschieden (40). Zwar konnten bereits in den frühen Heilungsphase nach 6, 9 und 12 Wochen vereinzelte Myofibroblasten morphologisch klar identifiziert werden (siehe Abbildung 26), jedoch

gab es immer wieder Präparate in denen, aufgrund der in dieser Frühphase noch nicht erfolgten Trennung von Gefäßen und Kollagenfasern, Perizyten und Myofibroblasten nicht klar von einander zu unterscheiden waren.

Aus diesem Grunde wurde die Auswertung der Myofibroblastendichte und –verteilung erst nach 24 Wochen durchgeführt, da hier die Gefäße mit begleitenden Perizyten durch bindegewebige Septen von den Kollagenfasern mit enthaltenen Myofibroblasten klar getrennt wurden (siehe auch Abbildung 27).

In je 5 Gesichtsfeldern pro Schnitt wurde die Anzahl der ASMA-positiven Myofibroblasten sowie ASMA-negative Fibroblasten ermittelt und der prozentuale Anteil an Myofibroblasten pro mm² errechnet.

2.9.2 Polarisationsmikroskopie

Die Polarisationsmikroskopie ist eine optische Methode, die Aussagen über die Ordnung von Molekülverbänden und über die strukturelle Beschaffenheit der Präparate ermöglicht. Hierbei wird das von einer Lichtquelle ausgesendete, in allen Achsen schwingende, diffuse Licht durch eine in den Lichtgang eingebrachte Folie, den Polarisator, zerlegt. Dabei entsteht ein außerordentlicher, d.h. nur in definierten Achsen schwingender Lichtstrahl und ein ordentlicher, d.h. in alle übrigen Schwingungsebenen schwingender Strahl. Der Polarisator läßt nur den außerordentlichen Strahl passieren, der übrige diffus streuende ordentliche Strahl wird durch Reflexion eliminiert. Trifft nun das in einer definierten Achse strahlende Licht auf gleichsinnig ausgerichtete Molekülverbände, wird die Lichtachse durch diese gleichsinnig gedreht. Eine in den weiteren Lichtgang eingebrachte Folie, der Analysator, läßt nun verstärkt das in der definierten Drehachse schwingende Licht hindurch. Hierdurch leuchten Strukturen, die das Licht durch gleichsame Ausrichtung gleichsinnig drehen, heller auf und lassen das zu untersuchende Präparat plastisch erscheinen.

2.9.2.1 Kollagencrimp

Mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie können Aussagen über die Kollagentertiärstruktur getroffen werden. Zur Ermittlung der Kollagenfibrillenfrequenz, dem sogenannten “Kollagencrimp”, wurden die Schnitte unter polarisiertem Licht mit

einer kalibrierten Skala vermessen. In je 10 Gesichtsfeldern eines Präparates wurde die mittlere Kollagenfibrillenfrequenz pro mm errechnet.

2.10 Statistische Auswertung

Alle histologischen Analysen und Zellzählungen wurden von zwei unabhängigen Untersuchern überprüft. Die Variabilität der Ergebnisse eines Untersuchers lag bei 10,3 %, die zwischen den Untersuchern bei 12,8 %.

Zur statistischen Datenanalyse wurde zunächst die Datenverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov Test durchgeführt. Bei fehlender Normalverteilung wurden statistische Vergleiche der verschiedenen Gruppen über die Zeit und Vergleiche innerhalb einer Gruppe mit dem Mann-Whitney-U Wilcoxon rank sum Test durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Allgemeines

3.1.1 Komplikationen

Von 41 operierten Tieren wurden 35 Tiere in den Hauptversuch aufgenommen. 2 Tiere mußten wegen eines intraoperativ ausgebrochenen femoralen Tunnels ausgeschlossen werden, 3 Tiere verstarben aufgrund von der Operation unabhängigen Ursachen (Aspirationspneumonie, Perikarditis, Ileus) nach 3 Tagen, 5 Wochen und 24 Wochen. Bei einem weiteren Tier der 52 Wochen Gruppe versagte das Transplantat und stellte sich nur noch als dünner fibröser Strang, der am hinteren Kreuzband haftete, dar.

3.1.2 Postoperativer Verlauf

Alle Tiere konnten unmittelbar nach dem Eingriff ihren operierten Hinterlauf nach Maßgabe der Beschwerden belasten. Die Vollbelastung wurde spätestens 4 Wochen nach Kreuzbandersatz wieder beobachtet. Sämtliche Arthrotomiewunden und Transplantatentnahmestellen verheilten reiz- und komplikationslos.

3.2 Explantation

Nach 6, 9, 12, 26, 52 und 104 Wochen wurden je 6 Tiere getötet. Die Kniegelenke der Hinterläufe wurden beidseits entnommen und, nach entsprechender Präparation und Einbettung der femoralen und tibialen Knochenenden, biomechanisch getestet. Es wurde die anterior-posteriore Translation im Schubladentest und Ausrißfestigkeit des vorderen Kreuzbandes ermittelt.

Von 36 Tieren konnten nach biomechanischer Testung pro Gruppe von je 5 Tieren das VKB-Transplantat entnommen und zur histologischen Analyse und Auswertung aufgearbeitet werden. Als Kontrollgruppe dienten 9 native vordere Kreuzbänder der Gegenseite und 6 Flexorsehnen als Transplantat zum Zeitpunkt Null.

3.3 Makroskopische Auswertung

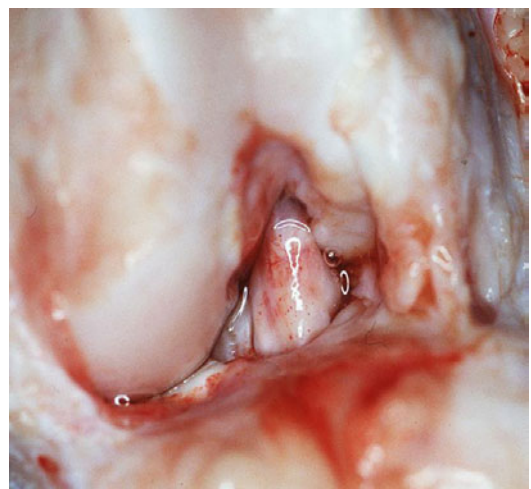
Natives vorderes Kreuzband und Flexorsehne:

Makroskopisch zeigte sich das native vordere Kreuzband von einer gut vaskularisierten synovialen Hülle umgeben, während die Flexorsehne zum Zeitpunkt Null von einer dünnen Schicht Peritendineum bedeckt war.

Frühe Remodellingphase (6 und 9 Wochen Standzeit):

Nach 6 Wochen zeigte das Kniegelenk noch geringe Entzündungszeichen, wie seröser Gelenkerguß und Gefäßinjektionen der Synovialis. Das Transplantat war bereits teilweise von einer reichlich vaskularisierten und hypertrophen Synovialschicht umhüllt.

Abbildung 12: Makroskopische Kniegelenksaufnahme 6 Wochen nach VKB-Ersatzes mit Darstellung des Transplantates, umgeben von einem stark vaskularisierten Synovialschlauch.



Intermediäre Remodellingphase (12 und 24 Wochen Standzeit):

Die makroskopische Untersuchung des Kniegelenks zeigte zu diesen Zeitpunkten keinerlei Entzündungszeichen. Das Transplantat war nach 12 Wochen noch von einer diskret verdickten synovialen Hüllschicht bedeckt und vaskularisiert. Nach 24 Wochen zeigte sich das Transplantat von einer straffen synovialen Hülle umgeben und makroskopisch nicht mehr von der Gegenseite zu unterscheiden.

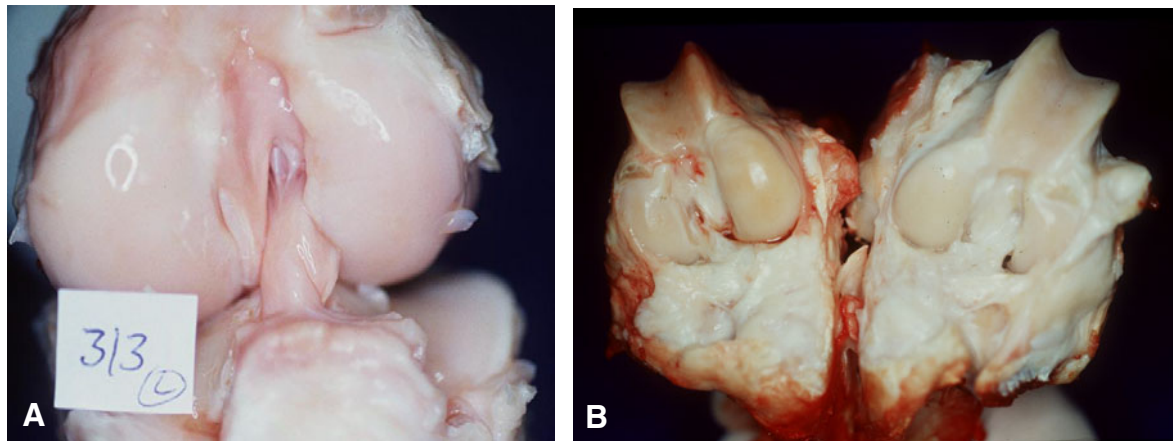


Abbildung 13: A.: 12 Wochen postoperativ zeigt sich das Transplantat noch diskret hypertroph vaskularisiert. B.: Nach 24 Wochen läßt sich das Transplantat (im Bild rechts dargestellt) nicht mehr vom nativen VKB (im Bild links dargestellt) unterscheiden (aus Weiler et al 2002 (121)).

Späte Remodellingphase (52 und 104 Wochen Standzeit):

In der späten Remodelingphase konnte weiterhin kein Unterschied des makroskopischen Erscheinungsbildes der Gelenke zu den nicht operierten Kontrollgelenken der Gegenseite festgestellt werden. Es gab keine Anzeichen einer inflammatorischen Veränderung und das Transplantat zeigte sich von einer straffen synovialen Hülle bedeckt.

3.4 Mikroskopische Auswertung

3.4.1 Konventionelle Lichtmikroskopie

3.4.1.1 Zellcharakterisierung und morphologisches Erscheinungsbild

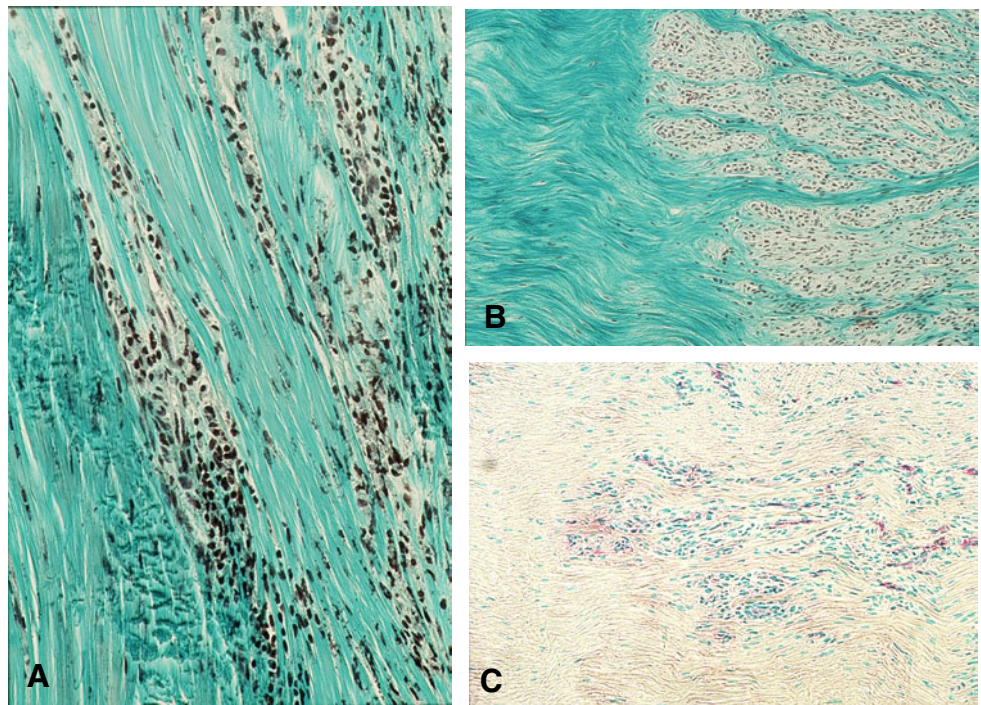
Im nativen vorderen Kreuzband wurde eine signifikant höhere Gesamtzellzahl ($810,4 / \text{mm}^2$) im Vergleich zur Flexorsehne ($245,8 / \text{mm}^2$, $p = 0,004$) gezählt. Die Fibroblasten des VKB zeigten in der Hämatoxylin-Eosin (H&E) Färbung im Gegensatz zur Flexorsehne mehr ovoide Zellkerne auf, deren Fibroblastenzellkerne streng spindelförmige imponierten.

In der Trichromfärbung nach Masson-Goldner stellte sich sowohl im VKB als auch in der Flexorsehne ein straffer paralleler Kollagenfaserverband dar, der von

bindegewebigen Septen durchzogen wird, die das intraligamentäre Kapillarnetz von den kollagenen Fasern trennt. Insgesamt erschien der Anteil der bindegewebigen Septen in der Flexorsehne geringer.

In der frühen Remodellingphase nach 6 Wochen zeigte sich in der konventionellen Lichtmikroskopie ein hyperzelluläres und hypervaskuläres Granulationsgewebe, welches fingerförmig von peripher nach zentral in das Transplantat einwuchs (Abbildung 14).

Abbildung 14: Transplantat, 6 Wochen nach VKB-Ersatz (Masson-Goldner Trichromfärbung (MG)): A: Hyperzellulärer Bindegewebsstrang (MG, 400x) B: Fingerförmig einwachsender Bindegewebsstrang (MG, 100x) C: Gefäßdarstellung in einwachsendem Bindegewebsstrang (Immunhistochemie, F.VIII, 100x) (je aus Weiler et al 2001 (122)).

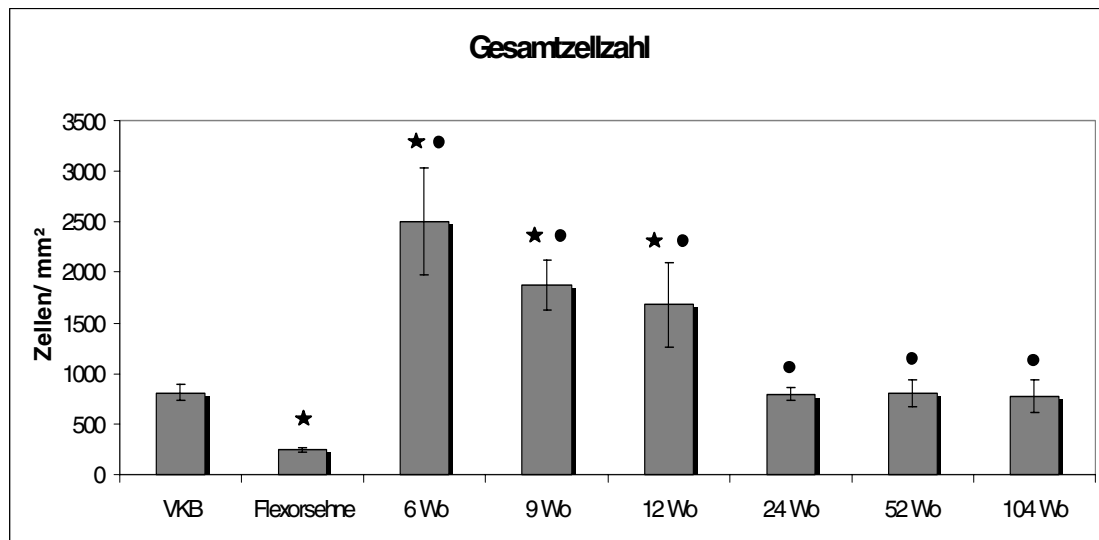


Die synoviale Deckschicht war deutlich verdickt auf bis zu 5 - 8 Zellagen eines mehrschichtigen Epithels.



Abbildung 15: Stark verdickte synoviale Deckschicht mit 5 - 8 Zellagen, Transplantat 6 Wochen postoperativ (MG 200x).

Intraligamentär dominierten plumpe Zellen mit meist runden bis ovoiden Zellkernen. Weiterhin zeigten sich noch verbliebene hypozelluläre nicht remodelierte Bereiche, die nur wenig vaskularisiert waren. Trotzdem wiesen die Transplantate aufgrund des hyperzellulären Granulationsgewebes nach 6 Wochen mit durchschnittlich 2508 Zellen /mm² eine signifikant höhere Gesamtzellzahl gegenüber allen anderen untersuchten Zeitpunkten auf (Graphik1).



★ signifikant gegenüber VKB, $p \leq 0,05$

● signifikant gegenüber Flexorsehne, $p \leq 0,05$

Graphik 1: Gesamtzellzahl/ mm² im VKB, der Flexorsehne, sowie dem Transplantat zu verschiedenen Standzeiten.

Nach 9 Wochen Standzeit konnten keine alten hypozellulären Bandanteile mehr nachgewiesen werden. Das histologische Erscheinungsbild wurde von unstrukturiertem und zellreichem Granulationsgewebe dominiert mit vorwiegend spheroiden Zellkernen. Die Gesamtzellzahl war gegenüber 6 Wochen mit durchschnittlich 1876 Zellen/ mm² bereits rückläufig, jedoch weiterhin signifikant erhöht gegenüber dem nativen VKB ($p = 0,008$) und der Flexorsehne ($p = 0,004$).

In der 12 Wochen Gruppe waren weiterhin hyperzelluläre Transplantate zu beobachten. Das Granulationsgewebe wies jedoch bereits eine regional beginnende Ordnung der kollagenen Fasern auf. Die Gesamtzellzahl verringerte sich kontinuierlich weiter, war jedoch im Vergleich zu den Kontrollgruppen (entsprechend $p = 0,008$ und $p = 0,004$) immer noch signifikant erhöht. Gefäße waren zunehmend nur noch in bindegewebigen Septen zwischen den Kollagenfasern nachzuweisen. Durch diese Trennung konnten in

einigen Regionen bereits Myofibroblasten auf Grund ihrer interfaszikulären Lage klar von Gefäßzellen und Perizyten unterschieden werden. Sie wiesen zu diesem Zeitpunkt einen ovoid bis spindelförmigen Zellkern auf.

Nach 24 Wochen nahm die Gesamtzellichte weiter auf 794,2 Zellen /mm² ab und erreichte damit erstmalig wieder die Zellzahl des nativen VKB (810,4 Zellen /mm²). Verglichen mit dem Transplantat zum Zeitpunkt Null (Flexorsehne), zeigte sich die Gesamtzellzahl signifikant erhöht ($p = 0.004$). Die nur noch vereinzelt auftretenden Gefäße waren durch bindegewebige Septen, von den kollagenen Fasern getrennt

Nach 52 (805,8/ mm²) und 104 Wochen (777,9/ mm²) zeigten die Transplantate eine Zelldichte vergleichbar mit dem nativen vorderen Kreuzband (810,4/ mm²). Die Zellen waren hauptsächlich ovoid bis fusiform und zeigten sich regelmäßig zwischen den Kollagenfasern verteilt. Im Vergleich zur nativen Flexorsehne zeigte sich eine signifikant höhere Gesamtzellzahl (je $p = 0,004$). Zwischen den 24, 52 und 104 Wochengruppen zeigte sich keine signifikante Änderung der Gesamtzellzahl.

3.4.1.2 Crimp

Mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie konnte eine Kollagenwellenlänge von $29,4 \pm 6,1$ µm im nativen vorderen Kreuzband gemessen werden. Diese war signifikant kürzer als im Flexorsehnentransplantat ($127,4 \pm 21$ µm, $p = 0,004$).

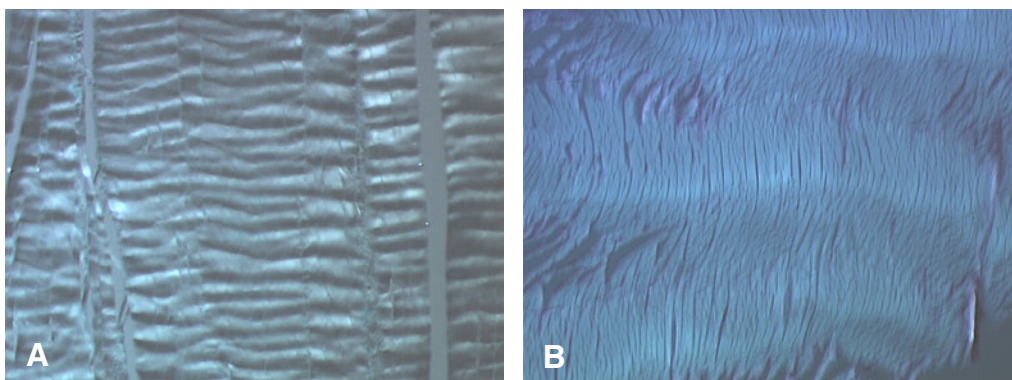


Abbildung 16: A.: Natives vorderes Kreuzband unter polarisiertem Licht: Es imponiert eine hochfrequente, regelmäßige Kollagentertiärstruktur (polarisiertes Licht 200x). B.: Sehne des M. flexor digitorum superficialis unter polarisiertem Licht: Es läßt sich im Vergleich zum nativen VKB eine deutlich niederfrequente Kollagentertiärstruktur abbilden (polarisiertes Licht 200x).

In frühen Phase der Transplantateinheilung zeigte sich nach 6 Wochen eine Kollagenwellenlänge von $105,2 \pm 52,7 \mu\text{m}$ ohne signifikanten Unterschied im Vergleich zum nativen VKB und dem Transplantat zum Zeitpunkt Null. Auffällig ist jedoch eine große Standardabweichung ($SD = 52,7$), welche die große Diversität der Wellenlängen in den verschiedenen Präparaten zu diesem Zeitpunkt abbildet.

Die Kollagenwellenlänge war nach 9 Wochen ($34,3 \pm 16 \mu\text{m}$) signifikant niedriger als im Flexorsehnengewebe ($p = 0,004$). Im Vergleich zum nativen VKB zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

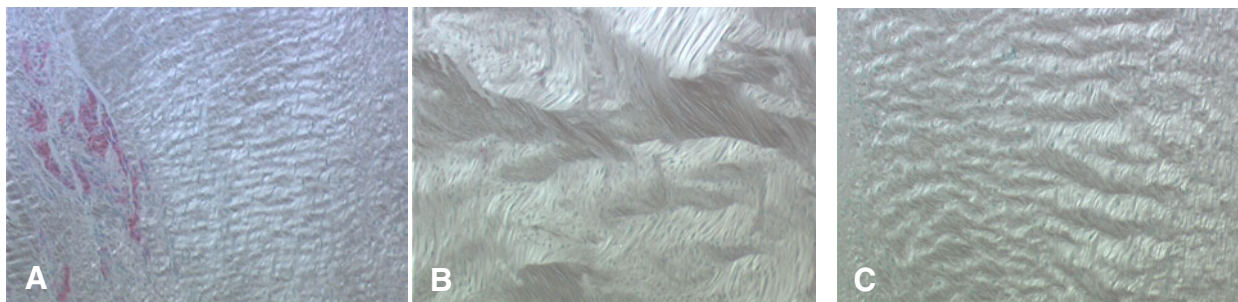


Abbildung 17: A/ B.: Nach 6 Wochen zeigt sich eine große Diversität der Kollagentertiärstruktur innerhalb eines Transplantates. Das Bandgewebe zeigt sich hinsichtlich seiner Kollagenstruktur sehr inhomogen. Es lassen sich in dieser frühen Remodelingphase neben neugebildetem hochfrequentem Granulationsgewebe (A) immer noch Abschnitte von avaskulärem und niedrigfrequentem "altem" Transplantatgewebe (B) nachweisen. C.: Nach 9 Wochen zeigt sich das Kollagen zunehmend homogen und es lässt sich nur noch vereinzelt altes niedrigfrequentes Kollagengewebe der Flexorsehne nachweisen.

Nach 12 Wochen zeigte sich ein irregulärer und hochfrequenter Kollagenwellenabstand ($25,5 \pm 6,6 \mu\text{m}$). Zu diesem Zeitpunkt war die Wellenlänge signifikant kürzer als im Flexorsehnengewebe ($p = 0,004$), während kein signifikanter Unterschied zum nativen VKB festzustellen war.

Nach 24 Wochen konnte weiterhin ein hochfrequenter Wellenabstand beobachtet werden ($16,8 \pm 3,3 \mu\text{m}$). Die Kollagenwellenlänge war signifikant kürzer als in der Flexorsehne ($p = 0,004$), dem nativen vorderen Kreuzband ($p = 0,008$) und im Transplantat nach 9 und 12 Wochen ($p = 0,016$) (siehe Graphik 2).

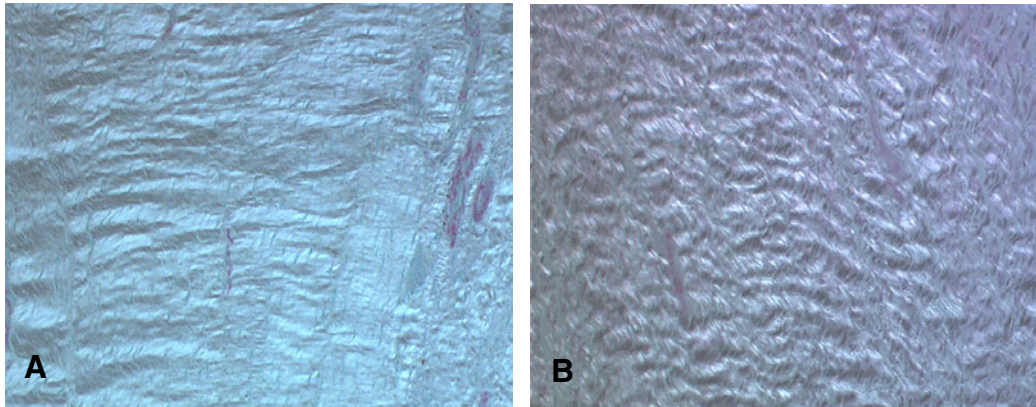


Abbildung 18: A.: Nach 12 Wochen zeigt sich im Vergleich zum nativen VKB kein signifikanter Unterschied des Kollagencrimps bei jedoch noch deutlicher Irregularität. B.: Nach 24 Wochen steigt die Frequenz der Kollagenwellen weiter an und ist signifikant kürzer als im nativen VKB, sowie nach 9 und 12 Wochen.

In der späten Remodellingphase unterschieden sich die Kollagenwellenlängen nach 52 ($18,8 \pm 3,1 \mu\text{m}$) und 104 Wochen ($18 \pm 2,9 \mu\text{m}$) kaum und zeigten sich signifikant kürzer im Vergleich zum nativen vorderen Kreuzband ($p = 0,016$ und $p = 0,008$) und dem nativen Flexorsehnen transplantat (je $p = 0.004$).

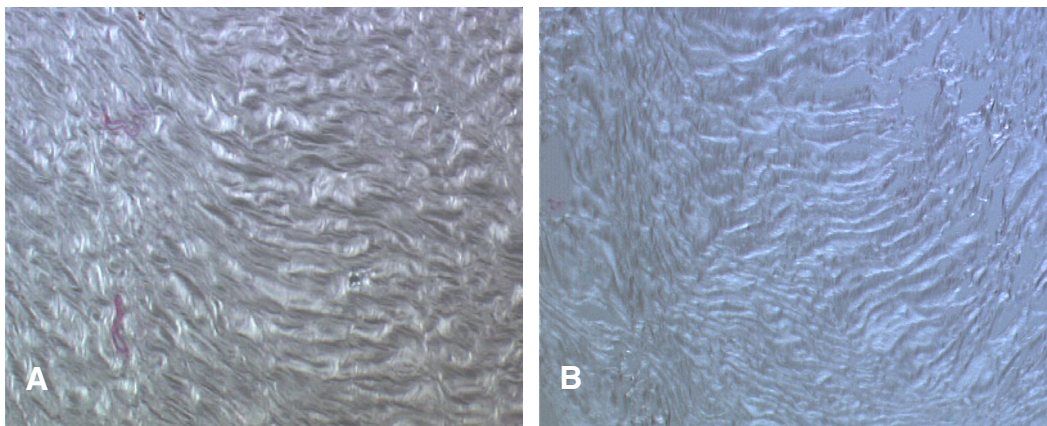
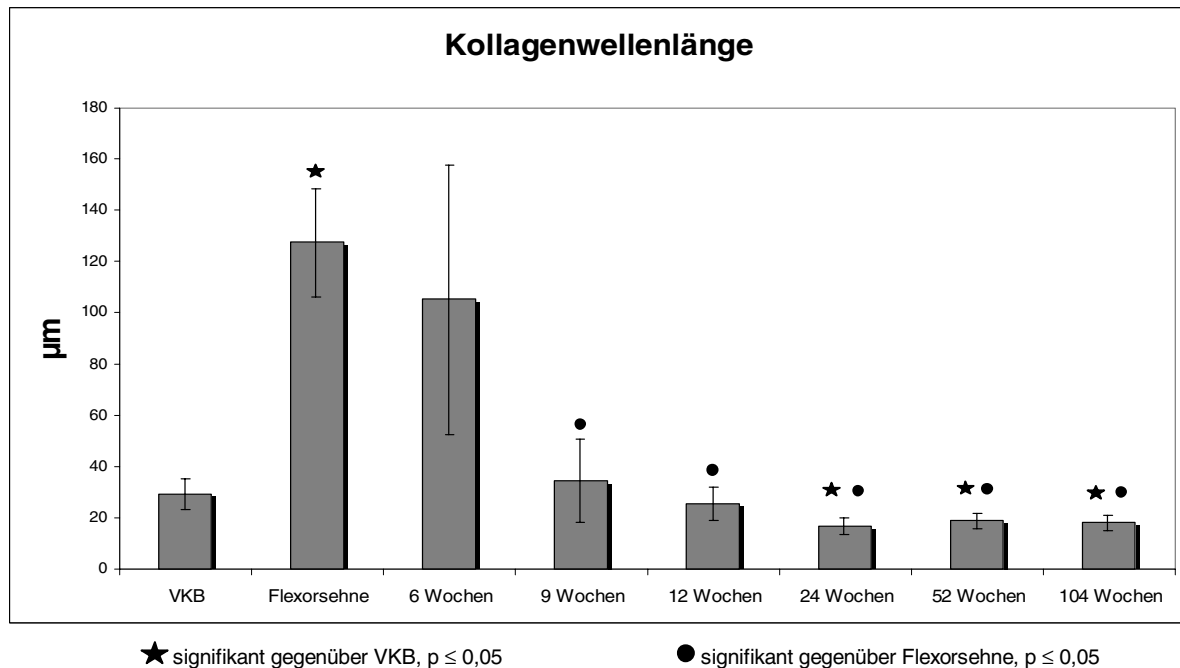


Abbildung 19: A.: Nach 52 Wochen zeigt sich eine homogene hochfrequente Kollagenstruktur. B.: Nach 104 Wochen imponiert weiterhin eine hochfrequente Kollagenstruktur mit signifikant geringerem Wellenabstand im Vergleich zum nativen VKB.



Graphik 2: Graphische Darstellung der Kollagenwellenlänge (Crimp)

3.4.2 Immunhistologie

3.4.2.1 Vaskularisierung und Revaskularisierung

In der immunhistologischen Färbung mit Faktor VIII ließ sich im nativen vorderen Kreuzband im Vergleich zur Flexorsehne in allen drei definierten Schichten eine signifikant höhere Anzahl an Gefäßanschnitten nachweisen (entsprechend $p = 0,012$, $p = 0,005$ und $p = 0,026$).

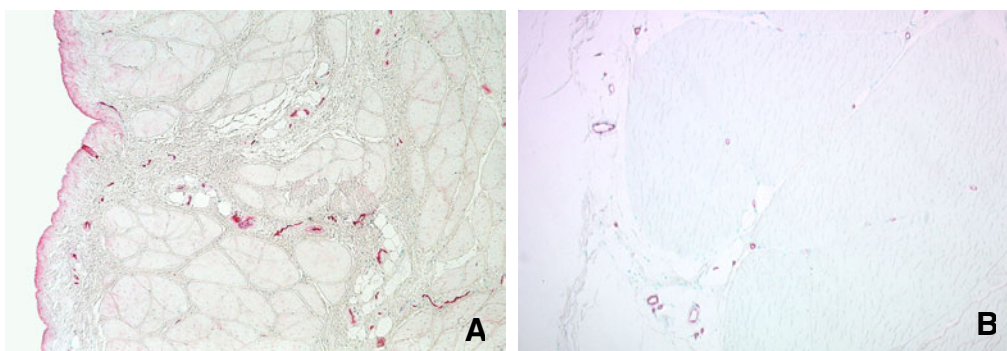


Abbildung 20: A.: Die immunhistologische Färbung des nativen vorderen Kreuzbandes zeigt F. VIII (von Willebrandt Faktor) positive Gefäßendothelzellen. Die Gefäße liegen in bindegewebigen Septen von den regelmäßig geformten Kollagenfasern getrennt (100x). B.: Darstellung der Gefäßquerschnitte in der Sehne des M. flexor digitorum superficialis zum Zeitpunkt Null. Die Immunhistologische Anfärbung von F. VIII zeigt nur vereinzelte Gefäßquerschnitte umhüllt von dünnen bindegewebigen Membranen zwischen den Kollagenfaszickeln (100x) (aus Unterhauser et al 2003 (115)).

Immunhistologisch zeigte sich nach 6 Wochen eine hohe subsynoviale Gefäßdichte (285,35 Gefäßanschnitte/ mm²) mit signifikant mehr Gefäßanschnitten als im nativen VKB oder der Flexorsehne zum Zeitpunkt null ($p= 0,001$ und $p= 0,004$). Auch die intermediäre und die zentrale Region zeigten eine signifikant höhere Gefäßdichte im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen.

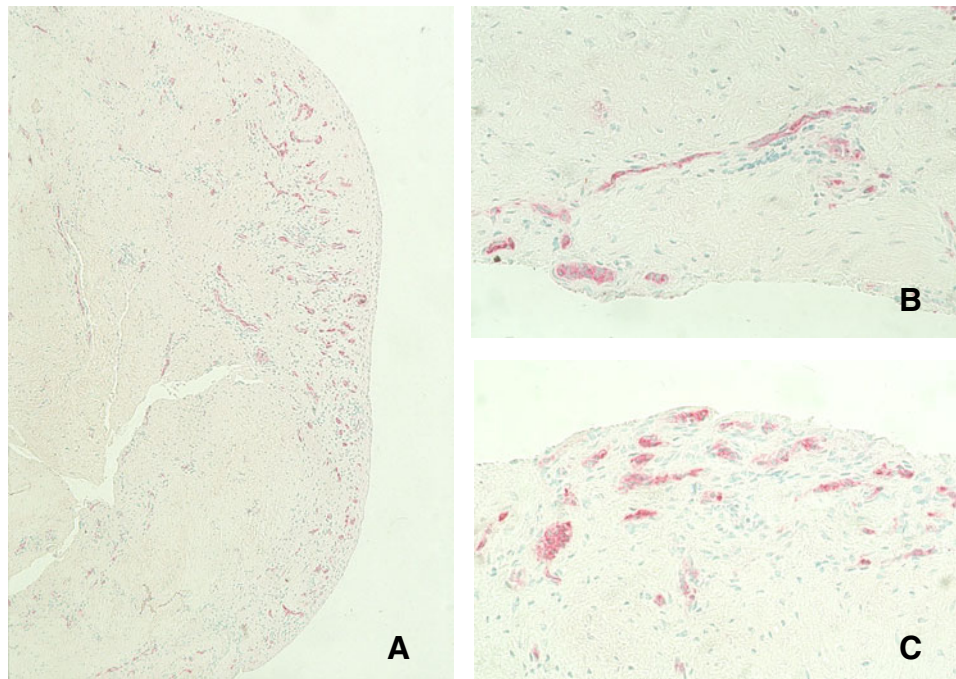


Abbildung 21: A.: Signifikant erhöhte Gefäßdichte der subsynovialen und intermediären Schichten nach 6 Wochen (Immunhistologie F.VIII 50x). B./ C.: Hypervaskularität der synovialen Deckzellschicht mit Gefäßen die in bindegewebigen Septen von Peripher nach Zentral einziehen (Immunhistologie F.VIII 200x)

Nach 9 Wochen Standzeit zeigte sich in allen drei Zonen gegenüber den Kontrollgruppen weiterhin eine signifikant erhöhte Anzahl von Gefäßen. Die Zahl der subsynovialen Gefäßanschnitte nahm im Vergleich zur 6 Wochen Gruppe deutlich ab (230,5 Gefäßanschnitte /mm²), blieb im intermediären Bereich nahezu konstant (197,1 Gefäßanschnitte /mm²), während die zentrale Region eine weiter zunehmende Anzahl von Gefäßanschnitten aufwies (133,37 Gefäßanschnitte /mm²).

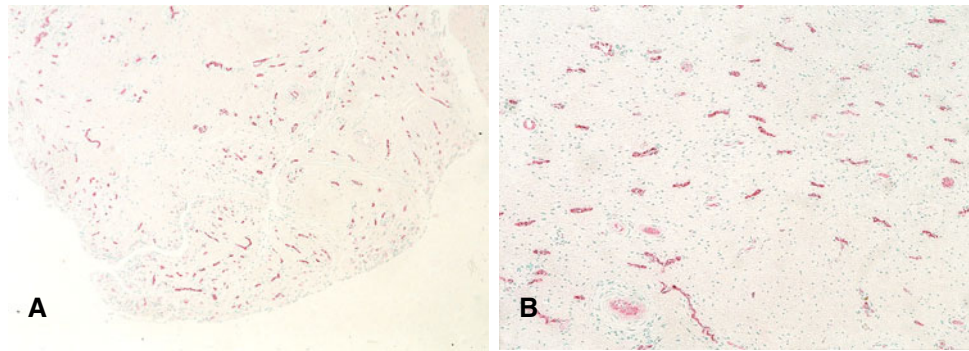


Abbildung 22: A.: Synoviale und subsynoviale Hypervaskularität 9 Wochen nach VKB-Ersatz. (Immunhistologische Färbung F.VIII, 50x)
B: Hypervaskularisierung des Transplantates nach 9 Wochen bis in die zentralen Anteile (Immunhistologische Färbung F.VIII, 200x)

Nach 12 Wochen blieb die Anzahl der Gefäßanschnitte/ mm² im Vergleich zu nativem VKB und Flexorsehne zum Zeitpunkt null in allen drei Zonen weiterhin signifikant erhöht. Im Gegensatz zur 6 und 9 Wochen Gruppe verringerte sich die Gefäßdichte subsynovial auf 146,6 Gefäßanschnitte /mm², wohingegen sie intermediär weiter annähernd (210,02 Gefäßanschnitte /mm²) konstant blieb und zentral auf 165,58 Gefäßanschnitte/ mm² weiter zunahm.

Nach 24 Wochen zeigte sich im Vergleich zum nativen VKB nur noch die Zentralzone signifikant stärker vaskularisiert ($p= 0,019$). Im Gegensatz zur Flexorsehne war die mittlere Anzahl von Gefäßanschnitten in der Intermediär- und Zentralzone signifikant erhöht.

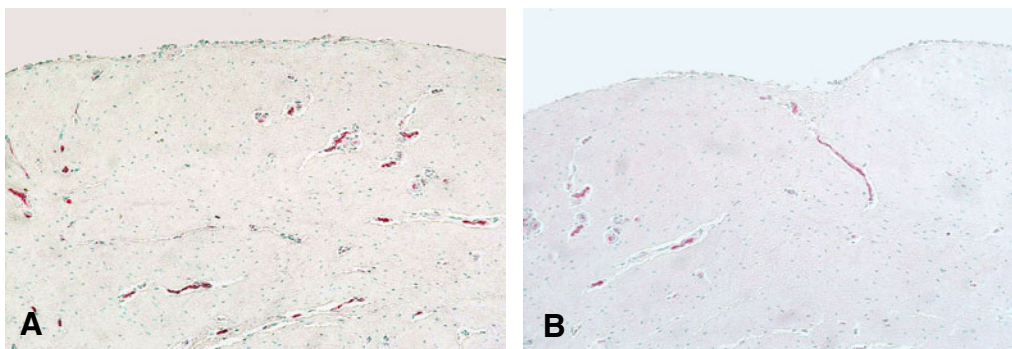
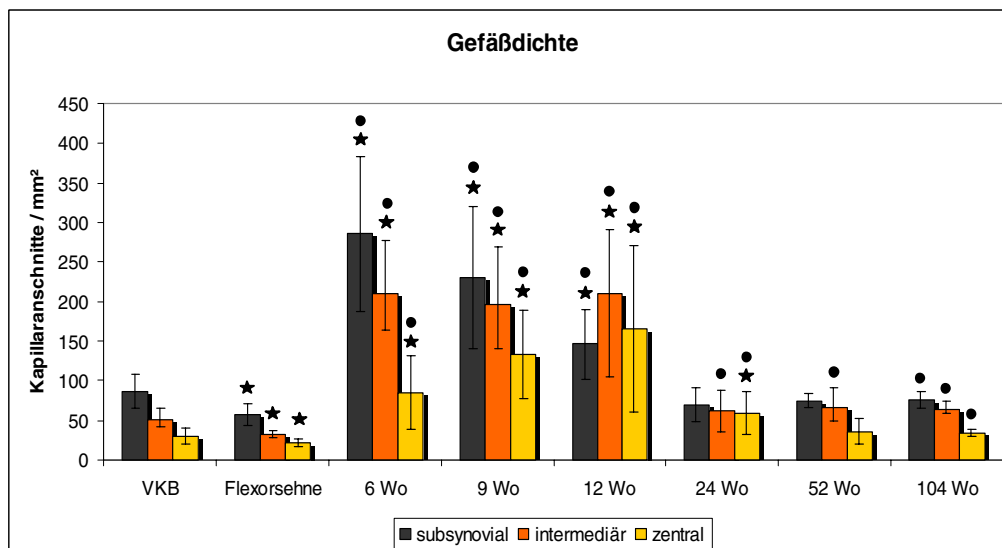


Abbildung 23: A.: Nach 12 Wochen zeigt sich eine deutlich reduzierte Vaskularität der subsynovialen Schicht, im Vergleich mit den 6 und 9 Wochen Präparaten. Es formieren sich erstmalig bindegewebige Septen, welche die Gefäße von den kollagenen Fasern trennen (Immunohistochemie Faktor VIII, 200x). B.: Nach 24 Wochen sind alle Gefäße vollständig von einer bindegewebigen Hülle umschlossen und gänzlich von den kollagenen Fasern getrennt. Bis auf die zentrale Schicht sind Gesamtzellzahl und Gefäßstatus des nativen vorderen Kreuzbandes erreicht (Immunohistochemie Faktor VIII, 200x) (aus Unterhauser et al 2003 (115)).

Bezüglich der Gefäßdichte konnte keine signifikante Änderung zum nativen VKB noch zum Transplantat nach 24 Wochen festgestellt werden, jedoch zeigte sich eine weiter abnehmende Zahl von kapillären Gefäßanschnitten in der zentralen Zone, bis erstmals nach 52 Wochen die Gefäßdichte des nativen VKB erreicht wurde. Subsynovial und intermediär blieb die Gefäßdichte über die Zeit von 24 bis 104 Wochen konstant.



Graphik 3: Darstellung der Gefäßdichte in den drei verschiedenen Zonen (subsynovial, intermediär und zentral) des nativen VKB, dem Transplantat zum Zeitpunkt 0 (Flexorsehne), sowie dem Transplantat zu den verschiedenen Explantationszeitpunkten (6-104 Wochen). Es zeigt sich ein deutlicher Rückgang der initial nach 6 Wochen massiven Gefäßexpression über die Zeit. Nach 24 Wochen erreicht das Transplantat subsynovial und intermediär bereits wieder eine dem nativen VKB vergleichbare Gefäßdichte und nach 52 Wochen ist der vaskuläre Status des nativen VKB vollständig erreicht und ändert sich auch nach 104 Wochen nicht mehr signifikant. Die Graphik zeigt weiterhin eine Revaskularisierungskinetik von peripher nach zentral (★ signifikant gegenüber VKB, $p \leq 0,05$; ● signifikant gegenüber Flexorsehne, $p \leq 0,05$)

Im Vergleich mit der Flexorsehne zum Zeitpunkt Null zeigte sich subsynovial und intermediär keine signifikante Änderung der Gefäßdichte nach 52 und 104 Wochen. In der Zentralzone war erst nach 104 Wochen keine signifikante Änderung der Gefäßdichte mehr festzustellen.

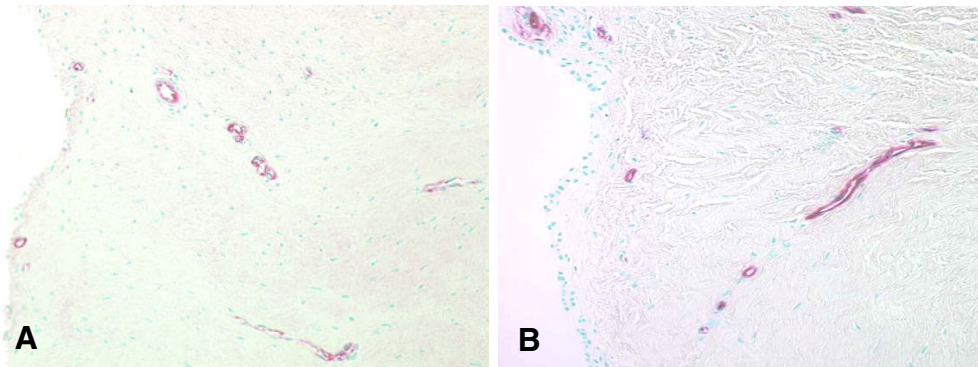


Abbildung 24: A.: Nach 52 Wochen hat das Transplantat den Gefäßstatus des vorderen Kreuzbandes erreicht (Immunhistochemie, F.VIII, 200x). B.: Nach 104 Wochen läßt sich keine weitere Veränderung der Vaskularität im Vergleich zum nativen VKB nachweisen (Immunhistochemie, F.VIII, 200x) (aus Unterhauser et al 2003 (115)).

3.4.2.2 Myofibroblasten

Bei der Färbung mit α -smooth-muscle Aktin zeigte sich in den Kontrollgeweben zum Zeitpunkt Null eine Myofibroblastendichte von $156/ \text{mm}^2$ im nativen vorderen Kreuzband, beziehungsweise $76,2/ \text{mm}^2$ in der Flexorsehne ($p = 0,009$). Der Klassifikation von Murray und Spector folgend (80), wiesen die Myofibroblasten im nativen VKB einen ovoiden Zellkern auf, im Gegensatz zu den dünnen spindelförmigen Zellkernen der Myofibroblasten des Flexorsehnentransplantates. Bezogen auf die Gesamtzellzahl, lag der prozentuale Anteil der MFB im hyperzellulären VKB mit 19,2 % wesentlich niedriger als im hypozellulären Flexorsehnentransplantat (32,3%).

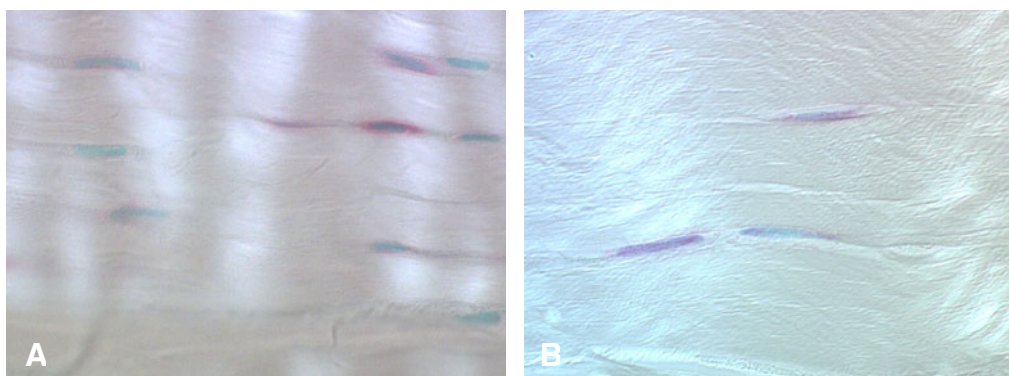


Abbildung 25: A.: Die immunhisto-chemische Färbung des intakten VKB zeigt ASMA-positive Myofibroblasten. Die Myofibroblasten sind ungleichmäßig verteilt und weisen eine ovoide Zellform auf (Immunhistologie, ASMA 200x, polarisiertes Licht). B.: Die Myofibroblasten der Flexorsehne weisen einen fusiformen Zellkern auf und sind gleichfalls unregelmäßig verteilt (Immunhistologie, ASMA 200x, teil-polarisiertes Licht) (Weiler et al 2002 (123))

Im einwachsenden reparativen Gewebe ließen sich eine hohe Anzahl α -smooth-muscle Aktin (ASMA) positive Zellen nachweisen. Jedoch war es zu diesem frühen Zeitpunkt nach 6 und 9 Wochen aufgrund des noch ungerichteten Granulationsgewebes noch nicht möglich, alle ASMA positiven Zellen klar den einzelnen Zelltypen zuzuordnen und Myofibroblasten klar von Perizyten und glatten Gefäßmuskelzellen zu trennen.

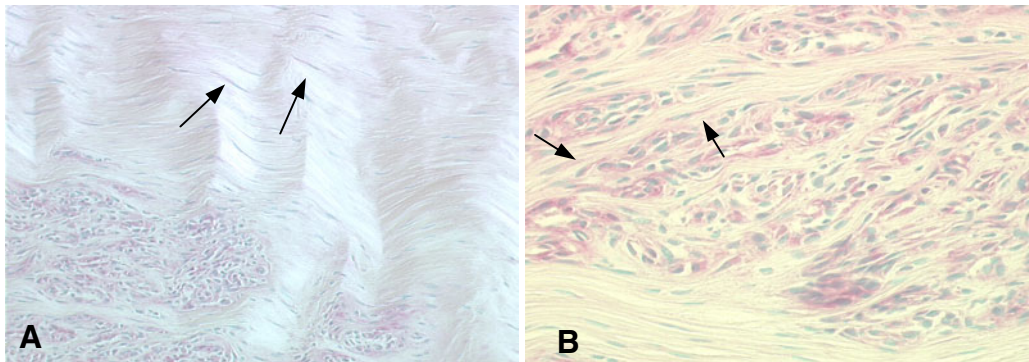


Abbildung 26: A.: Nach 6 Wochen zeigt sich eine deutliche Myofibroblastenexpression in einwachsendem Granulationsgewebe). Es zeigt sich deutlich eine Degradation der Kollagenfasern und ihrer Tertiärstruktur, dem Kollagen-Crimp. Das alte, nicht remodelierte Bandgewebe weist vereinzelte Myofibroblasten auf (Pfeile) (Immunhistologie, ASMA 100x, teil-polarisiertes Licht.) B.: Die weitere Vergrößerung des einwachsenden Granulationsgewebes zeigt neu formiertes Kollagengewebe in dem spindelförmige Myofibroblasten nachgewiesen werden können (Pfeile). (Immunhistologie, ASMA 100x, teil-polarisiertes Licht) (aus Weiler et al 2002 (**123**))

Aufgrund der Trennung der Gefäße von den Kollagenfasern durch bindegewebige Septen konnte nach 24 Wochen eine klare morphologische Abgrenzung der Myofibroblasten (MFB) von Perizyten und glatten Gefäßmuskelzellen getroffen werden, und diese eindeutig identifiziert werden.

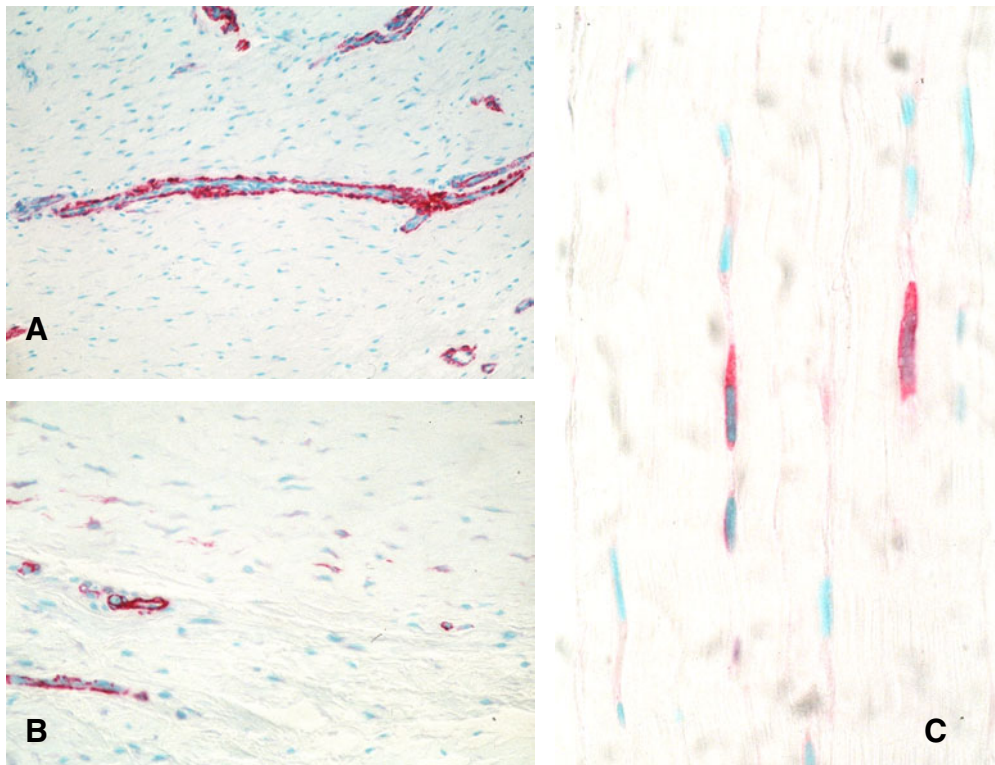


Abbildung 27: A.: Bei immunhistologischer Färbung mit anti- α -smooth-muscle Aktin werden glatte Muskelzellen von Gefäßen dargestellt. B: In der unmittelbaren Umgebung von Gefäßen lassen sich Myofibroblasten nicht eindeutig von Perizyten unterscheiden (Immunhistochemie, F. VIII, 100x). C.: Nach 24 Wochen lassen sich Myofibroblasten aufgrund ihrer Morphologie von Perizyten und rein intraligamentärer Lage von glatten Gefäßmuskelzellen differenzieren (Immunhistochemie, F. VIII, 400x)

Die Verteilung der MFB im Transplantat zeigte sich insgesamt sehr unregelmäßig. Die MFB waren teilweise longitudinal aligniert und konnten mit Hilfe der Polarisationsmikroskopie parallel zur Wellenformation der Kollagenfasern ausgerichtet lokalisiert werden

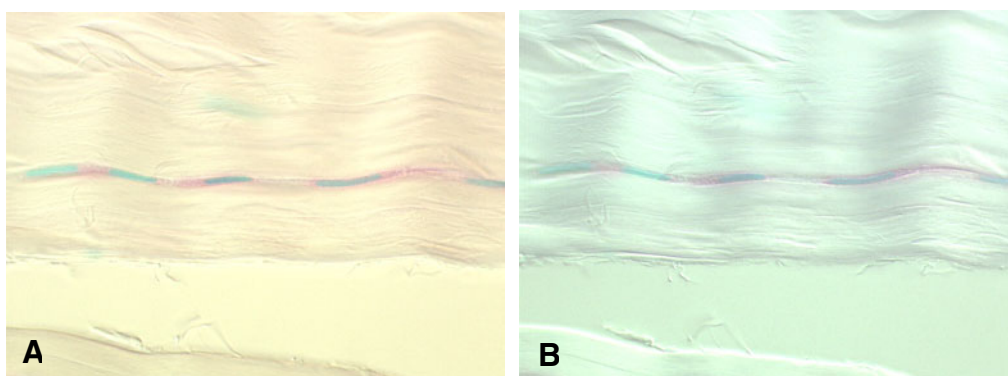


Abbildung 28: A.: ASMA exprimierende Myofibroblasten konnten im Kollagenfaserverband nachgewiesen werden (24 Wochen ASMA, 400x) B: Sie zeigten sich longitudinal entlang der kollagenen Fasern orientiert (gleiches Präparat wie A, 400x, polarisiertes Licht)

Nach 24 Wochen zeigte sich kein signifikant höherer Anteil an Myofibroblasten (252.8 /mm²) im Vergleich zum nativen VKB und der Flexorsehne.

In der immunhistochemischen Färbung mit anti- α -smooth-muscle Aktin konnten nach 104 Wochen signifikant mehr Myofibroblasten (330,2 MFB/ mm²) nachgewiesen werden, als im nativen VKB (156 MFB/ mm²) ($p=0,008$) und in der Flexorsehne (76,2 / mm²) ($p=0,004$), während sich nach 52 Wochen (288,6 MFB/ mm²) nur gegenüber der Flexorsehne eine signifikante Veränderung der MFB-Zahl zeigte ($p=0,004$).

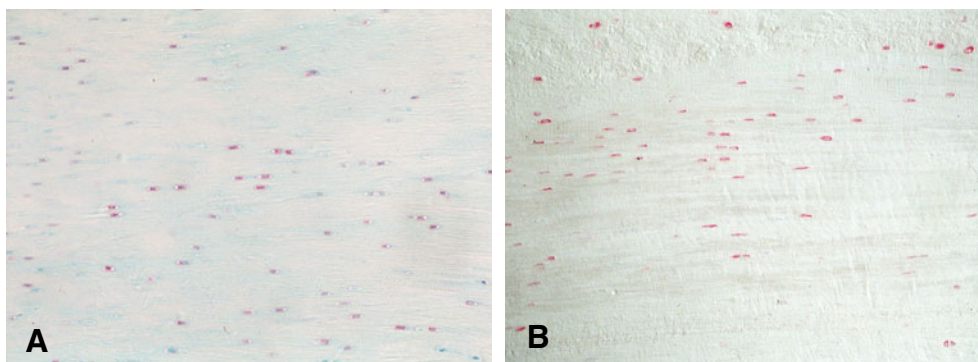


Abbildung 29: A.: Nach 52 Wochen stieg der Anteil der ASMA exprimierenden Myofibroblasten weiter an. Sie wiesen eine ovoide Zellform auf und waren weiterhin unregelmäßig verteilt (Immunhistochemie ASMA, 200x). B.: Nach 104 Wochen stieg der Anteil an Myofibroblasten im Vergleich zum nativen VKB weiter an. Die Zellen zeigten erneut eine ovoide Form (Immunhistochemie ASMA, 200x).

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit war es möglich, mit Hilfe immunhistochemischer Färbetechniken zwei Teilaspekte des Remodelingprozesses, die Revaskularisierung und den Nachweis von Myofibroblasten im freien Sehnentransplantat nach vorderem Kreuzbandersatz, weiter aufzuklären.

So gelang es die Revaskularisierung des freien Sehnentransplantates auf kapillärer Ebene über die Zeit darzustellen. Dabei zeigte sich der Ablauf der Revaskularisierung früher beendet, als in der Literatur bislang dargestellt **(4,9,57,63,104)**. Neugebildete Kapillaren wachsen ausgehend von der synovialen Oberfläche, in das avaskuläre Transplantatgewebe horizontal in Richtung Transplantatmitte ein. Die größte Gefäßdichte im Transplantatgewebe konnte dabei 6 Wochen nach VKB-Ersatz nachgewiesen werden. Die Anzahl der Gefäßquerschnitte reduzierte sich in den Folgezeit kontinuierlich und bereits nach 24 Wochen erreichte das Transplantat subsynovial und intermediär den vaskulären Status des nativen vorderen Kreuzbandes. Die Blutversorgung des vorderen Kreuzbandes wurde in vielen Studien bereits eingehend untersucht **(4,9,38,91,105)**. Ausgehend von Ästen der Arteria genicularis medialis sowie Arteria genicularis inferior, werden Gefäße der synovialen Hüllschicht des vorderen Kreuzbandes gespeist **(9)**. Dieses periligamentäre synoviale Gefäßnetz steht über transversale Gefäßanastomosen mit einem hoch verzweigten Netzwerk feinsten endoligamentärer Kapillaren in Verbindung **(4)**. Ein freies Sehnentransplantat wird nach Entnahme zur Rekonstruktion des VKB nicht mehr perfundiert und ist ohne Anschluß an das filligrane Gefäßnetzwerk des zu ersetzenden vorderen Kreuzbandes. Um ein Remodelling des Transplantates zu ermöglichen und somit die Langzeitintegrität des Kreuzbandersatzes zu gewährleisten, muß das Gewebe notwendigerweise revaskularisiert werden.

In der Literatur lassen sich viele unterschiedliche und zum Teil auch gegensätzliche Meinungen im Bezug auf die Revaskularisierung eines Kreuzbandtranslantates nach Rekonstruktion finden **(3,7,10-12,32,67,104)**. Es ist jedoch sehr schwierig bisherige Studien miteinander zu vergleichen, da sowohl unterschiedliche Tiermodelle, als auch unterschiedlich sensitive Methoden (Kontrastmittel, Farbstoffe, Laser Dopplerflowmetrie) zum Nachweis einwachsenden Gefäße verwendet wurden.

Bei der Darstellung des intraligamentären Gefäßsystems mit Kontrastmitteln (Spalteholz, Tusche, röntgendichte Substanzen) wird die Perfusionsmöglichkeit

kleinster Kapillaren, durch die Partikelgröße der verwendeten Substanzen selbst, limitiert. Auch die Gefäßperfusion mit löslichen Farbstoffen kann oftmals nicht das gesamte feine Kapillarnetzwerk erfassen **(32,91)**. Bei zu hohem Injektionsdruck besteht die Gefahr, daß das Kontrastmittel paravasal austritt und ein falsch positives Ergebnis zeigt, falsch negative Ergebnisse können durch zu niedrigen Injektionsdruck, Mikroembolien oder Arteriosklerose entstehen **(91)**. Die Technik der Laser Dopplerflowmetrie ist eine elegante nicht-invasive Methode, oberflächliche Blutflüsse darzustellen. In einer Untersuchung von Jakobsson und Nilsson, bezüglich der Meßtiefe in verschiedenen Geweben, konnten in Hautpräparaten jedoch nur Gefäße in einer maximalen Tiefe von 250 µm erfaßt werden **(60)**. Somit erscheint es zweifelhaft, ob intraligamentär gelegene Kapillaren mit Hilfe dieser Technik hinreichend erfaßt und dargestellt werden können.

Im Gegensatz zu den zuvor verwendeten Methoden zur Darstellung von Gefäßen, wurde in der vorliegenden Studie eine Technik verwandt, die nicht von Perfusionskapazität oder Größe der röntgendichten Partikel abhängig ist. Die Immunhistochemie ist eine hoch spezifische Methode, mit der ein bestimmtes Antigen durch einen spezifischen Antikörper identifiziert und markiert wird. Der in der Studie verwendete Antikörper ist gegen den auf der Zelloberfläche von Endothelzellen lokalisierten v. Willebrandt Faktor (F. VIII) gerichtet und erlaubt es selbst kleinste Kapillaren, im Endstromgebiet bereits ohne glatte Gefäßmuskelzellen, klar zu identifizieren.

Die vorliegende Arbeit zeigt ein kontinuierliches Einwachsen von Kapillaren in das avaskuläre Transplantatgewebe. Obwohl das Transplantat zum Zeitpunkt seiner Implantation keine synoviale oder periligamentäre vitale Hüllschicht aufwies, kann davon ausgegangen werden, daß die einwachsenden Kapillaren der Synovialis entstammen, welche sich innerhalb der ersten Heilungswochen um das Transplantat legt (siehe Abbildung 12). Die Tatsache, daß die zentrale Zone des Transplantates als letzte Zone nach der subsynovialen und intermediären den Gefäßstatus des nativen VKB erreicht, läßt schlußfolgern, daß die Revaskularisierung des Transplantates von peripher nach zentral abläuft.

Diese Beobachtungen decken sich mit denen anderer Studien **(10,17,86,100)**. In diesen vorangegangenen Arbeiten zeigte sich, daß die einwachsenden Gefäße hauptsächlich dem periligamentären Gewebe wie Fettkörper und Synovialis

entspringen **(10)**. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, daß, nach Resektion von Fettkörper oder synovialer Hüllschicht, Revaskularisierung und Reperfusion mit erheblicher Verzögerung einhergehen **(17,86,100)**.

Andere Arbeitsgruppen wiederum schließen eine Revaskularisierung des Transplantatgewebes jedoch aus **(5,66)**. Die Autoren gehen davon aus, daß die zelluläre Repopulation des Transplantatgewebes ohne vaskuläre Beteiligung stattfindet und das die einwandernden Zellen während der ersten 3 Wochen allein durch die Synovialflüssigkeit per diffusionem versorgt werden **(66)**. Es erscheint nichtsdestotrotz fraglich, ob ein kräftiger und funktionell intakter Kreuzbandersatz auf Dauer allein durch synoviale Diffusion versorgt werden kann **(5)**.

Auch Untersuchungen am Menschen zur Transplantatrevasikularisierung nach VKB-Ersatz zeigen gegensätzliche Ergebnisse. So berichten Puddu et al. **(92)** von einer deutlichen Transplantathypervaskularisierung, einer persistierenden Hyperzellularität und ungeordneten Kollagenfaszikel im Transplantatgewebe noch nach über 12 Monaten nach Ersatz. Andere Autoren hingegen, bezweifeln eine endoligamentäre Revaskularisierung nach VKB-Ersatz **(63)**. Johnson et al **(63)** wiesen in einer histologischen Studie über das Verhalten von Sehnentransplantaten nach Kreuzbandersatz im Menschen nach 20 Tagen vitale und gleichmäßig verteilte Zellen nach, ohne Anzeichen einer Revaskularisierung. Die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Untersuchungen am Menschen ergeben sich aus der Schwierigkeit, repräsentative Gewebeproben aus dem intakten Kreuzbandersatz zu entnehmen, ohne dabei das Transplantat zu schwächen oder gar zu schädigen. Mit den deshalb meist nur oberflächlichen entnommenen Biopsien, wird jedoch statt des Transplantatgewebes zumeist nur synoviale Oberfläche und fibröses reorganisiertes Gewebe gewonnen, was zu falsch positiven Schlußfolgerungen führen mag **(63)**.

Howell et al. **(57)** analysierten die Revaskularisierung von Hamstringsehnen nach Kreuzbandersatz im Menschen mittels kontrastmittelverstärkter Magnetresonanztomographie (MRT). In dieser Arbeit konnten die Autoren auch nach einem Jahr keine signifikante Anhebung des intraligamentären Gefäßsignals feststellen. Die Autoren schließen damit eine Revaskularisierung des Transplantatgewebes im Rahmen des Remodelingprozesses aus und machen allein

die synoviale Diffusion für die Versorgung des freien Sehnen transplantates mit Nährstoffen und Sauerstoff verantwortlich.

Im Rahmen der vorliegenden Studie war es uns möglich, eigene MRT-Untersuchungen an den operierten Tieren, zu den verschiedenen Standzeiten, durchzuführen **(122)**. Dabei zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation zwischen mechanischen Eigenschaften und der Signalintensität **(122)**. Im Vergleich zu den Ergebnissen von Howell et al. am Menschen, konnten wir 6 und 12 Wochen nach VKB-Ersatz eine signifikante intraligamentäre Signalanhebung beobachten. Eine dem nativen vorderen Kreuzband vergleichbare Signalintensität konnte 2 Jahre postoperativ festgestellt werden. Diese Ergebnisse korrelieren mit der Kinetik der Revaskularisierung in der vorliegenden Arbeit und spiegeln so den Reifungsprozeß des Kreuzbandtransplantates über die Zeit wider **(122)**.

Darüber hinaus konnte die biomechanische Auswertung der Kreuzbandrekonstruktion mittels freiem Sehnen transplantat eine Korrelation zwischen Ausrißfestigkeit des Transplantates und seiner Revaskularisierung zeigen **(121)**. Das Transplantat wies bezüglich anterior-posteriorer Translation und Ausrißkraft nach 6 und 9 Wochen seine geringste Widerstandskraft auf. Diese Zeitpunkte korrelieren mit dem größten Gefäßgehalt des Transplantates. Bei abnehmender Gefäßdichte über die Zeit, zeigte das Transplantat eine zunehmende Ausrißfestigkeit und erreichte nach 2 Jahren nahezu die Festigkeit des nativen vorderen Kreuzbandes. Petersen et al konnten nachweisen, das die Expression von des Angiogenesefaktors vascular endothelial growth factor (VEGF) und seinen Rezeptoren während der ersten 12 Wochen des Remodelingprozesses am höchsten ist. Im Verlauf des weiteren Remodelingprozeß verringert sich die Expression und ist somit ebenfalls korrelierend mit der Gefäßdichte und der Ausrißkraft des Transplantates **(90)**.

Eine mögliche Erklärung der unterschiedlichen Beobachtungen am Menschen und im Tier, kann im Tiermodel selbst zu finden sein. Es ist möglich, daß ein freies Sehnen transplantat im Tiermodel anderen Remodeling- und Reifungsbedingungen unterliegt als im humanen Knie und daher mit einer unterschiedlichen Revaskularisierung einhergeht. Während des Remodelingprozeß des Sehnen transplantates, haben biologischen Einflüsse, wie die synoviale Transplantatumgebung und der Hoffa'sche Fettkörper, sowie postoperative Hämorrhagie und Inflammation, einen wichtigen Einfluß auf zelluläre Repopulation und

Revaskularisierung. Darüber hinaus spielen Faktoren wie Transplantatwahl, –fixierung, –isometrie und Kollagenbündelorientierung, sowie dem postoperative Management eine entscheidende Rolle. Die mechanische Belastbarkeit des Transplantates wird bei fehlender oder übermäßiger Zugbelastung signifikant reduziert, durch eine Änderung der Kollagenstruktur, aufgrund des fehlenden oder überschießenden Stimulus **(113)**. Um diesen Stimulus bereits nach Implantation zu erreichen und einem übermäßigen Setzverhalten des Transplantats entgegen zu wirken, wird empfohlen, das Transplantat vor Fixierung vorzuspannen **(113)**. Es ist denkbar, daß im Tiermodell aufgrund inadäquater Transplantatvorspannung und –positionierung ein intensiveres Remodeling, und damit eine intensivere Revaskularisierung, stattfindet. Diese Hypothese wird durch ein in-situ Gefriermodell an der Ziege **(59)** unterstützt. In diesem Modell wurde das vordere Kreuzband, unter Beibehaltung seiner originären Insertionsstellen, durch Schockgefrieren devitalisiert. Nach 26 und 52 Wochen zeigte sich das so vorbehandelte VKB weiterhin weniger vaskularisiert, als das native, unbehandelte VKB. Darüber hinaus konnte eine dem remodelierenden VKB-Transplantat vergleichbar überschießende Revaskularisierung nicht beobachtet werden.

Aus diesen Überlegungen läßt sich schlußfolgern, daß ein freies Sehnen transplantat bei Ablauf eines intensiven Remodelings, auch eine Phase intensiver Revaskularisierung durchläuft. Dabei wird das Transplantatgewebe, ausgehend von der synovialen Oberfläche, horizontal in Richtung Transplantatmitte revaskularisiert. Die Revaskularisierung unterliegt weiterhin einer strengen Kinetik, die die mechanischen Eigenschaften des Transplantates entscheidend mitbestimmt **(121)**.

Im weiteren Teil der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob hochdifferenzierte Fibroblasten, sogenannte Myofibroblasten, einen regulären Bestandteil des vorderen Kreuzbandes und seines Ersatzgewebes, eines freien Sehnen transplantates, darstellen.

Es konnte erstmalig nachgewiesen werden, daß α -smooth-muscle Aktin exprimierende Fibroblasten ein fester Bestandteil des ovinen vorderen Kreuzbandes und seines Ersatzgewebes, dem Musculus flexor digitorum superficialis, sind. Diese Ergebnisse decken sich mit anderen Arbeiten, in denen Myofibroblasten in Sehnen- und

Bandgewebe, wie im humanen vorderen Kreuzband **(80)** und medialen Kollateralband (MCL) **(40)** des Kaninchen, nachgewiesen wurden.

Seit der Entdeckung der Schlüsselrolle, die Myofibroblasten während der Gewebekontraktion bei der Wundheilung und bei Organfibrosen spielen **(46,99)**, wird die Hypothese gestellt, daß diese Zellen die Fähigkeit haben, Zugkräfte auf die extrazelluläre Matrix auszuüben und damit das Gewebe zu kontrahieren **(40,45,103)**.

Das klinische Bild der Dupuytren'schen Kontraktur verdeutlicht eindrücklich die Fähigkeit dieser Zellen, Gewebe zu kontrahieren **(47)**. Am Bewegungsapparat ist die Kontraktion des Granulationsgewebes ein wichtiger Bestandteil zur Wiedererlangung der normalen in-situ Spannung. Nach der Entdeckung von Myofibroblasten während der Bandheilung des medialen Kollateralbandes des Kaninchen, wird vermutet, daß diese Zellen für die Wiedererlangung der normalen Bandspannung nach Teilruptur von großer Bedeutung sind **(40)**. Im Gegensatz dazu zeigen in-vitro Studien, daß Myofibroblasten hauptsächlich isometrische Zugkräfte ausüben und weniger isotonische Kontraktionskräfte **(53)**. Soweit uns bekannt, gibt es jedoch bislang keine Untersuchungen, die den Mechanismus der Filamentkontraktion in diesem Zelltyp in-vivo beschreibt.

In unserer Studie zeigte sich bereits in der frühen Remodellingphase nach 6 und 9 Wochen eine starke Immunreaktivität für α -smooth muscle Aktin. Es konnten vereinzelt fusiforme Myofibroblasten in neu gebildeten Kollagensträngen nachgewiesen werden. Wie im vorherigen Abschnitt zur Revaskularisierung dargestellt, zeigte sich in der frühen Heilungsphase nach 6 und 9 Wochen die größte Gefäßdichte mit einer extrem ausgeprägten Expression von Faktor VIII der Endothelzellen im Transplantatgewebe. Aus diesem Grunde konnten zu diesem Zeitpunkt die α -smooth muscle Aktin positiven Myofibroblasten nur aufgrund ihrer fusiformen Zellform von glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten differenziert werden. Der Nachweis dieser Zellen innerhalb der neu geformten Faserbündeln, mag einen Hinweis darauf geben, daß Myofibroblasten bereits in der frühesten Heilungsphase involviert sind. Weiterhin konnten wir auch Myofibroblasten im nicht remodelierten Transplantatgewebe nach 6 Wochen nachweisen. Das könnte darauf hinweisen, daß dieser Zelltyp auch bis 6 Wochen nach Implantation weiterhin vital bleibt. Nach 24, 52 und 104 Wochen fand sich ein, dem nativen vorderen Kreuzband vergleichbarer Myofibroblastenanteil, wenn er auch nach 104 Wochen signifikant höher war **(123)**.

Diese Daten zeigen, daß α -smooth muscle Aktin exprimierende Zellen ein fester Bestandteil des vorderen Kreuzbandes, sowie des remodelierenden Transplantates sind. Aufgrund der Tatsache, daß diese Zellen während des Remodeling des freien Sehnen- und Bandtransplantates wieder auftauchen, scheint es offensichtlich, daß diese Zellen für das Wiedererreichen der Bandhomöostase und Kollagenformation mitverantwortlich sind. Die genaue Rolle und Funktion der Myofibroblasten in Sehnen- und Bandgewebe, besonders im vorderen Kreuzband, bleibt jedoch weiterhin unklar.

In einer kürzlich erschienenen Arbeit von Murray und Spector **(80)** wurde die Morphologie und Verteilung von α -smooth muscle Aktin positiven Zellen im anteromediale Bündel des nativen humanen vorderen Kreuzband untersucht. Die Autoren zeigten, daß der mittlere Anteil von Myofibroblasten zwischen 9 und 28 Prozent aller Zellen im nativen humanen VKB beträgt. Aufgrund der unterschiedlichen Morphologie der beobachteten Myofibroblasten, konnten Murray und Spector das anteromediale Bündel in 3 verschiedene Abschnitte unterteilen. Einen proximalen, mit vornehmlich fusiformen Myofibroblasten, einen mittleren, mit ovoiden und einen distalen Abschnitt mit hauptsächlich spheroiden Myofibroblasten. Der prozentual höchste Anteil von Myofibroblasten wurde in der distalen spheroiden Zone nachgewiesen **(80)**.

In der vorliegenden Studie wurde nur das mittlere Drittel des Kreuzbandes untersucht. Es konnten hauptsächlich ovoide Zellen im nativen, ovinen VKB, als auch im Transplantatgewebe nach 24, 52 und 104 Wochen, gefunden werden. Es zeigte sich eine konstant ansteigende Anzahl von MFB zwischen den Standzeiten nach 24 bis 104 Wochen. Nach 104 Wochen schließlich konnten signifikant mehr Myofibroblasten im Vergleich zum nativen VKB gezählt werden. Diese Tatsache läßt vermuten, daß der VKB-Ersatz auch nach 2 Jahren postoperativ noch nicht den funktionellen Status des intakten vorderen Kreuzbandes erreicht hat. Andererseits wäre denkbar, daß sich im remodelierten Bandgewebe verschiedene funktionelle Zonen ausgebildet haben, mit einer wesentlich höheren Anzahl an Myofibroblasten pro Teilzone im Vergleich zum nativen VKB. Bei der Wahl der Schnittebene ist es möglich, unterschiedlich funktionelle Zonen mit unterschiedlicher Anzahl an MFB getroffen zu haben.

Murray und Spector vermuteten, daß α -smooth muscle Aktin exprimierende Fibroblasten aufgrund ihrer gut ausgebildeten Zell-Stroma-Verbindung, den Fibronexus,

für die Fältelung der Extrazellulärmatrix und der Bildung der Kollagentertiärstruktur, dem sogenannten Crimp, mitverantwortlich sind **(80)**. Diese Hypothese wurde durch ihre Entdeckung erhärtet, daß die Bandzonen mit dem kürzesten Wellenabstand den größten Anteil an Myofibroblasten zeigten. Darüber hinaus konnten Murray und Spector Myofibroblasten am Scheitelpunkt der Wellenberge ausmachen **(80)**. In-vitro Studien zeigten zusätzlich, daß Myofibroblasten die Fähigkeit besitzen, Membranen oder Zellkulturmedium durch Kontraktion zu verkürzen **(14,53,73)**.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir eine ähnliche Beobachtung machen. Der größte Frequenzabstand zwischen zwei Wellenbergen (Kollagencrimp) konnte in der intakten Flexorsehne ermittelt werden, gefolgt vom intakten vorderen Kreuzband. Den niedrigsten Anteil an Myofibroblasten zeigte sich ebenfalls in der Flexorsehne, dann im VKB. Dagegen wies das remodelierende Transplantatgewebe den kürzesten Crimp in Kombination mit dem größten Anteil an MFB, im Vergleich zu Flexorsehne und vorderen Kreuzband, auf. Damit bestätigen unsere Ergebnisse grundsätzlich die Hypothese von Murray und Spector, auch wenn wir keine spezifische MFB-Verteilung im Bezug auf Kollagenfaszikel und Crimpstruktur, weder im Flexorsehnengewebe noch im nativen oder remodelierenden vorderen Kreuzband feststellen konnten.

Während Myofibroblasten eine wichtige Funktion zur Aufrechterhaltung der Matrixhomöostase einer intakten Sehne oder eines Bandes haben mögen, mag die phenotypische Entwicklung des Fibroblasten zum MFB auch mit der Bildung funktioneller Bindegewebsstrukturen einhergehen **(52,111)**. In gleicher Art und Weise könnten Myofibroblasten auch im Prozeß der Geweberestrukturierung während des Remodelings eines freien Sehnentransplantates, oder der Ligamentisierung nach VKB-Ersatz mitwirken. Tatsächlich könnten die in dieser Studie nach 6 Wochen in neu gebildeten Kollagenfibrillen gefundenen fusiformen Myofibroblasten darauf hindeuten, daß diese Zellen bereits in der frühesten Phase der Kollagenfibrillenbildung und -formierung während des Transplantatremodelings eine wichtige Rolle spielen (siehe Abbildung 26).

Zusammenfassend läßt sich postulieren, das α -smooth muscle Aktin exprimierende Fibroblasten, sogenannte Myofibroblasten, einen regulären Bestandteil des intakten, als auch des remodelierten vorderen Kreuzbandes darstellen. Es gibt eindeutige Hinweise darauf, daß diese Zellen, beispielsweise durch die Bildung des

Kollagenkrimps, an der Aufrechterhaltung der Gewebekomöostase mit beteiligt sein könnten.

Die Präsenz dieser Zellen während der frühen Remodellingphase läßt weiterhin vermuten, daß α -smooth muscle Actin exprimierende Zellen in der frühesten Phase der Bildung von Kollagenfibrillen mitbeteiligt sind.

Jedoch bleiben auch weiterhin viele Fragen bezüglich der Funktion und Rolle im Gewebeverband unbeantwortet, welche weitere Untersuchungen diesbezüglich anregen sollten.

5. Zusammenfassung

Um das Langzeitüberleben eines Kreuzbandtransplantates nach Ersatz des VKB zu gewährleisten muß das Transplantat revaskularisiert werden. Trotz zahlreicher Studien zu diesem Thema gibt es noch immer eine kontroverse Diskussion bezüglich der Revaskularisierung von Kreuzbandtransplantaten. Ziel der vorliegenden Studie war es die endoligamentäre mikropilläre Revaskularisierung eines freien Sehnen transplantates mit Hilfe immunhistochemischer Färbetechnik darzustellen und ihren Verlauf über die Zeit zu dokumentieren. Darüber hinaus sollten die im Rahmen des Remodelingprozesses nach vorderem Kreuzbandersatz ablaufenden Ab- und Aufbauprozesse der Extrazellulärmatrix des Transplantates weiter aufgeklärt werden. Bei der Heilung des medialen Kollateralband des Kniegelenkes wurden kontraktile fibroblastische Zellen entdeckt, die eine mögliche Rolle bei der Wiederherstellung der Matrixhomöostase spielen. Nach Entdeckung dieses Zelltyps im intakten vorderen Kreuzbandes wurde vermutet, Myofibroblasten könnten eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Kollagentertiärstruktur spielen. In der vorliegenden Studie sollte aufgeklärt werden, ob Myofibroblasten im intakten ovinen vorderen Kreuzband und seinem freien Sehnen transplantat nach VKB-Ersatz während des Remodelings wieder auftaucht.

36 ausgewachsene Merinoschafe erhielten einen vorderen Kreuzbandersatz mittels ipsilateralem Flexorsehnen transplantat. Nach je 6, 9, 12, 24, 52 und 104 Wochen wurden 6 Tiere getötet und das mittlere Drittel des Kreuzbandtransplantates histologisch aufgearbeitet. Neben konventionellen Färbungen zur Auswertung von Gesamtzellzahl und Crimpstruktur wurden immunhistochemische Färbungen mit anti-v. Willebrandt Factor (Factor VIII) zum Nachweis von Endothelzellen der Gefäßwand und anti- α -smooth-muscle Aktin zum Nachweis von Myofibroblasten durchgeführt. In Querschnittpräparaten, je in 3 Zonen (subsynovial, intermediär und zentral) unterteilt, wurden Gefäßanschnitte ausgezählt. In Längsschnittpräparaten wurden Myofibroblasten nachgewiesen. Die Auswertungen wurden mit Hilfe eines digitalen Bildanalysesystems vorgenommen.

Die Untersuchungen zur Revaskularisierung zeigten von peripher nach zentral über die Zeit einwachsende Kapillaren. Die größte Dichte an Gefäßanschnitten wurde nach 6 Wochen gefunden, der Gefäßstatus des nativen VKB wurde nach 24 Wochen erreicht.

Myofibroblasten konnten sowohl im intakten VKB als auch im Flexorsehnentransplantat vor Implantation nachgewiesen werden. Weiterhin konnten Myofibroblasten erstmalig auch im remodelierenden Bandgewebe bereits nach 6 Wochen innerhalb neu gebildeter Kollagenfasern identifiziert werden.

Die vorliegende Studie konnte damit erstmalig die Kinetik der endoligamentären Revaskularisierung auf kapillärer Ebene darstellen. Im vorliegenden Modell war die Revaskularisierung wesentlich früher abgeschlossen als zuvor beschrieben. Myofibroblasten stellen einen regulären Bestandteil sowohl des nativen als auch des remodelierenden VKB dar. Dabei könnten diese Zellen eine wichtige Rolle bei der Wiedererlangung der Gewebemöostase durch die Ausbildung der Kollagentertiärstruktur spielen. Die Präsenz dieser Zellen während der frühen Remodellingphase läßt weiterhin vermuten, daß α -smooth muscle Actin exprimierende Zellen in der frühesten Phase der Bildung von Kollagenfibrillen mitbeteiligt sind.

Literatur

1. AAOS press release: 6 Million A Year Seek Medical Care For Knees. *Arthroscopy* 1997
2. Adler K, Craighead J, Vallyathan N, Evans J: Actin-containing cell in human pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 102:427-437, 1981
3. Alm A, Stromberg B: Transposed medial third of patellar ligament in reconstruction of the anterior cruciate ligament: A surgical and morphologic study in dogs. *Acta Chir Scand* 445 (Suppl):37-49, 1974
4. Alm A, Stromberg B: Vascular anatomy of the patellar and cruciate ligaments: A microangiographic and histologic investigation in the dog. *Acta Chir Scand* 445 (Suppl):25-35, 1974
5. Amiel D, Akeson WH, Renzoni S, Harwood F, Abel M: Nutrition of cruciate ligament reconstruction by diffusion: Collagen synthesis studied in rabbits. *Acta Orthop Scand* 57:201-203, 1986
6. Amiel D, Frank C, Harwood F, Fronek J, Akeson W: Tendons and ligaments: a morphological and biochemical comparison. *J Orthop Res* 1:257-265, 1984
7. Amiel D, Kleiner JB, Roux RD, Harwood FL, Akeson WH: The phenomenon of "ligamentization": anterior cruciate ligament reconstruction with autogenous patellar tendon. *J Orthop Res* 4:162-172, 1986
8. Andersson C, Odensten M, Gillquist J: Knee function after surgical or nonsurgical treatment of acute rupture of the anterior cruciate ligament: a randomized study with a long-term follow-up period. *Clin Orthop* 255-263, 1991
9. Arnoczky SP: Blood supply to the anterior cruciate ligament and supporting structures. *Orthop Clin North Am* 16:15-28, 1985

10. Arnoczky SP, Rubin RM, Marshall JL: Microvasculature of the cruciate ligaments and its response to injury: An experimental study in dogs. *J Bone Joint Surg* 61A:1221-1229, 1979
11. Arnoczky SP, Tarvin GB, Marshall JL: Anterior cruciate ligament replacement using patellar tendon: An evaluation of graft revascularization in the dog. *J Bone Joint Surg* 64A:217-224, 1982
12. Arnoczky SP, Warren RF, Ashlock MA: Replacement of the anterior cruciate ligament using a patellar tendon allograft: An experimental study. *J Bone Joint Surg* 68A:376-385, 1986
13. Arnold JA, Coker TP, Heaton LM, et al: Natural history of anterior cruciate tears. *Am J Sports Med* 7:305-313, 1979
14. Arora PD, McCulloch CA: Dependence of collagen remodelling on alpha-smooth muscle actin expression by fibroblasts. *J Cell Physiol* 159:161-175, 1994
15. Augustine RW: The unstable knee. *Am J Surg* 92:380-388, 1956
16. Baur P, Parks D: The myofibroblast anchoring strand: The fibronectin connection in wound healing and the possible loci of collagen fibril assembly. *J Trauma* 23:853-862, 1983
17. Benedetto KP, Klima G: [Effect of the Hoffa fat pad on revascularization of the ruptured anterior cruciate ligament: A histologic study of the rabbit model]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 124:262-265, 1986
18. Bhathal PS: Presence of modified fibroblasts in cirrhotic livers in man. *Pathology* 4:139-144, 1972
19. Bircher E: Die Arthroendoskopie. *Zentralbl Chir* 1460-1461, 1921
20. Bircher E: Beitrag zur Pathologie und Diagnose der Meniscus-Verletzung. *Bruns Beitr Klin Chir* 127:239-250, 1922

21. Boenisch T: Antikörper. *Handbuch immunchemischer Färbemethoden II* 3:9-15, 2002
22. Bonnet A: *Traité des maladies des articulations*, pp 1-1,300. Paris, Baillière, 1845
23. Bonnet A: *Traité de thérapeutique des maladies articulaires*. pp 354-357. Paris, Baillière, 1853
24. Bosch U, Kasperczyk W, Oestern H, Tscherne H: Die Einheilungsphasen beim autogenen hinteren Kreuzbandersatz. *Unfallchirurg* 93:187-196, 1990
25. Bosch U, Kasperczyk WJ: [The healing process after cruciate ligament repair in the sheep model]. *Orthopade* 22:366-371, 1993
26. Bosworth D, Bosworth B: Use of fascia lata to stabilize the knee in cases of ruptured crucial ligaments. *J Bone Joint Surg* 17:178-179, 1936
27. Burman MS, Finkelstein H, Mayer L: Arthroscopy of the knee-joint. *J Bone Joint Surg* 16:255-268, 1934
28. Butler DL, Noyes FR, Grood ES: Ligamentous restraints to anterior-posterior drawer in the human knee. A biomechanical study. *J Bone Joint Surg [Am]* 62:259-70, 1980
29. Campbell W: Repair of ligaments of the knee. *Surg Gynecol Obstet* 9:64, 1936
30. Campbell W: Reconstruction of the ligaments of the knee. *Am J Surg* 43:473-480, 1939
31. Claes L, Neugebauer R: In vivo and in vitro investigation of the longterm behavior and fatigue strength of carbon fibre ligamnt replacement. *Clin Orthop* 196:99, 1985

32. Clancy JrWG, Narechania RG, Rosenberg TD, Gmeiner JG, Wisnefske DD, Lange TA: Anterior and posterior cruciate ligament reconstruction in rhesus monkeys. *J Bone Joint Surg Am* 63:1270-1284, 1981
33. Coons A.H., Creech H.J., Jones R.N.: Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med* 200-202, 1941
34. Cotton FJ, Morris GM: Artificial ligaments at the knee: Technique. *New Engl J Med* 210:1331, 1934
35. Cubbins WR, Conley AH, Callahan JJ: A new method of operating for the repair of the ruptured crucial ligaments of the knee joint. *Surg Gynecol Obstet* 54:299-306, 1932
36. Denk H: Immunhistochemische Färbemethoden. In: *Mikroskopische Technik* pp 251-261. Ed by P Böck. München, Wien, Baltimore, Urban & Schwarzenberg, 1989
37. Dittel L: Ueber intraarticuläre Verletzungen am Knie. In: *Wiener Med Jahrbücher* pp 319-334. 1876
38. Dodds JA, Arnoczky SP: Anatomy of the anterior cruciate ligament: a blueprint for repair and reconstruction. *Arthroscopy* 10:132-9, 1994
39. Dupont JY, Scellier C: [Intra-articular lesions and their development in old ruptures of the anterior cruciate ligament]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot* 72 Suppl 2:112-114, 1986
40. Faryniarz DA, Chaponnier C, Gabbiani G, Yannas IV, Spector M: Myofibroblasts in the healing lapine medial collateral ligament: possible mechanisms of contraction. *J Orthop Res* 14:228-237, 1996
41. Feagin JA, Curl WW: Isolated tear of the anterior cruciate ligament: 5 year follow-up study. *Am J Sports Med* 4:95-100, 1976

42. Fetto JF, Marshall JL: The natural history and diagnosis of anterior cruciate insufficiency. *Clin Orthop* 147:29-38, 1980
43. Frank C, Woo SL, Amiel D, Harwood F, Gomez M, Akeson W: Medial collateral ligament healing. A multidisciplinary assessment in rabbits. *Am J Sports Med* 11:379-389, 1983
44. Fukubayashi T, Torzilli PA, Sherman MF, Warren RF: An in vitro biomechanical evaluation of anterior-posterior motion of the knee. Tibial displacement, rotation, and torque. *J Bone Joint Surg Am* 64:258-264, 1982
45. Gabbiani G: Some historical and philosophical reflections on the myofibroblast concept. *Curr Top Pathol* 93:1-5, 1999
46. Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR, Majno G: Granulation tissue as a contractile organ. A study of structure and function. *J Exp Med* 135:719-734, 1972
47. Gabbiani G, Majno G: Dupuytren's contracture: fibroblast contraction? An ultrastructural study. *Am J Pathol* 66:131-146, 1972
48. Gabbiani G, Ryan GB, Majne G: Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* 27:549-550, 1971
49. Galway RD, Beaupre A, MacIntosh DL: "Pivot shift": A clinical sign of symptomatic anterior cruciate deficiency. *J Bone Joint Surg (B)* 54:763-764, 1972
50. Grood ES, Noyes FR: Cruciate ligament prosthesis: Strength, creep, fatigue properties. *J Bone Joint Surg (A)* 58:1083-1088, 1976
51. Halata Z, Wagner C, Baumann KI: Sensory nerve endings in the anterior cruciate ligament (Lig. cruciatum anterius) of sheep. *Anat Rec* 254:13-21, 1999

52. Harris AK, Stopak D, Wild P: Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature* 290:249-251, 1981
53. Harris A, Wild P, Stopak D: Silicone rubber substrata: A new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science* 208:177-179, 1980
54. Helfet AJ: Function of the cruciate ligament of the knee joint. *Lancet* 1:665-667, 1948
55. Herman IM: Actin isoforms. *Curr Opin Cell Biol* 5:48-55, 1993
56. Hey Groves E: Operation for repair of the crucial ligaments. *Lancet* 674-675, 1917
57. Howell S, Knox K, Farley T, Taylor M: Revascularization of a human anterior cruciate ligament graft during the first two years of implantation. *Am J Sports Med* 23:42-49, 1995
58. Inoue M, McGurk-Burleson E, Hollis JM: Treatment of the medial collateral ligament injury: I. The importance of anterior cruciate ligament on the varus-valgus knee laxity. *Am J Sports Med* 15-21, 1987
59. Jackson D, Grood E, Cohn B, Arnoczky S, Simon T, Cummings J: The effects of in situ freezing on the anterior cruciate ligament. *J Bone Joint Surg* 73-A:201-213, 1991
60. Jakobsson A, Nilsson GE: Prediction of sampling depth and photon pathlength in laser Doppler flowmetry. *Med Biol Eng Comput* 31:301-307, 1993
61. Jenkins DHR, McKibbin B: The role of flexible carbon fibre implants as tendon and ligament substitute in clinical practice. *J Bone Joint Surg (B)* 62:497-499, 1980
62. Johansson H, Sjörlander P, Sojka P: A sensory role for the cruciate ligaments. *Clin Orthop* 268:161-178, 1991

63. Johnson LL: The outcome of a free autogenous semitendinosus tendon graft in human anterior cruciate reconstructive surgery: A histological study. *Arthroscopy* 9:131-42, 1993
64. Jones R, Smith A: On rupture of the crucial ligaments of the knee and on fractures of the spine of the tibia. *Br J Surg* 1:70-89, 1913
65. Kennedy JC: Application of prosthetics to anterior cruciate reconstruction and report. *Clin Orthop* 172:125-128, 1983
66. Kleiner JB, Amiel D, Harwood FL, Akeson WH: Early histologic, metabolic, and vascular assessment of anterior cruciate ligament autografts. *J Orthop Res* 7:235-242, 1989
67. Kleiner JB, Amiel D, Roux RD, Akeson WH: Origin of replacement cells for the anterior cruciate ligament autograft. *J Orthop Res* 4:466-474, 1986
68. Kreuzschner PH: Semilunar cartilage disease. A plea for early recognition by means of the arthroscope and early treatment of this condition. *Int Med J* 47:290-292, 1925
69. Lindstrom N: cruciate ligament plastics with meniscus. *Acta Orthop Scand* 29:150-151, 1959
70. Lobenhoffer H: Kniebandverletzungen. I. Anatomie, Biomechanik, Diagnostik, Indikationsstellung. *Chirurg* 70:219-230, 1999
71. Losee RE, Johnston TR, Southwick WO: Anterior subluxation of the lateral tibia plateau. *J Bone Joint Surg (A)* 60:1015-1030, 1978
72. Macey HB: A new operative procedure for repair of ruptured cruciate ligaments of the knee joint. *Surg Gynecol Obstet* 69:108-109, 1939

73. Masur SK, Dewal HS, Dinh TT, Erenburg I, Petridou S: Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4219-4223, 1996
74. Mauck HP: A new operative procedure for instability of the knee. *J Bone Joint Surg* 18:984-990, 1936
75. Mayo Robson AW: Ruptured cruciate ligaments and their repair by operation. *Ann Surg* 716-718, 1903
76. Menzel A: Ueber die Erkrankung der Gelenke bei dauernder Ruhe. *Arch Klin Chir* 12:990-1011, 1871
77. Meyers JF, Grana WA, Lesker PA: Reconstruction of the anterior cruciate ligament in dog. Comparison of results obtained with three different porous synthetic materials. *Am J Sports Med* 7:85-96, 1979
78. Miyata K, Yasuda K, Kondo E, Nakano H, Kimura S, Hara N: Biomechanical comparisons of anterior cruciate ligament: reconstruction procedures with flexor tendon graft. *J Orthop Sci* 5:585-92, 2000
79. Murray MM, Martin SD, Martin TL, Spector M: Histological changes in the human anterior cruciate ligament after rupture. *J Bone Joint Surg Am* 82-A:1387-1397, 2000
80. Murray MM, Spector M: Fibroblast distribution in the anteromedial bundle of the human anterior cruciate ligament: the presence of alpha-smooth muscle actin-positive cells. *J Orthop Res* 17:18-27, 1999
81. Nagle RB, Kneiser MR, Bulger RE, Benditt EP: Induction of smooth muscle characteristics in renal interstitial fibroblasts during obstructive nephropathy. *Lab Invest* 29:422-427, 1973

82. Noulis G. Entorse du genou. Thèse No 142. 1-53. 1875. Faculté de Paris, Derenne, Paris.
Ref Type: Thesis/Dissertation
83. Noyes FR, Bassett RW, Grood ES, Butler DL: Arthroscopy in acute traumatic hemarthrosis of the knee. Incidence of anterior cruciate tears and other injuries. *J Bone Joint Surg Am* 62:687-95, 757, 1980
84. O'Donoghue DH: Surgical treatment of the major injuries to ligaments of the knee. *J Bone Joint Surg* 721-738, 1950
85. O'Donoghue DH: An analysis of end results of surgical treatment of major injuries to ligaments of the knee. *J Bone Joint Surg (A)* 37:1-13, 1955
86. O'Donoghue DH, Frank GR, Jeter GL, Johnson W, Zeiders JW, Kenyon R: Repair and reconstruction of the anterior cruciate ligament in dogs. Factors influencing long-term results. *J Bone Joint Surg Am* 53:710-718, 1971
87. O'Donoghue DH, Rockwood CA, Jr., Frank GR, Jack SC, Kenyon R: Repair of the anterior cruciate ligament in dogs. *J Bone Joint Surg Am* 48:503-519, 1966
88. Palmer I: On the injuries of the ligaments of the knee joint. *Acta Chir Scand* 2-282, 1938
89. Pässler H, Stadler J, Berger R: Erste Ergebnisse der operativen Behandlung von 200 veralteten Kreuzbandrupturen mit einem Kunststoffband. *Hefte Unfallheilk* 189:963, 1987
90. Petersen W, Unterhauser F, Pufe T, Zantop T, Sudkamp N, Weiler A: The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed during the remodeling of free tendon grafts in sheep. *Arch Orthop Trauma Surg* 123:168-174, 2003
91. Petersen W, Tillmann B: Structure and vascularization of the cruciate ligaments of the human knee joint. *Anat Embryol* 200:325-334, 1999

92. Puddu G, Ippolito E: Reconstruction of the anterior cruciate ligament using the semitendinosus tendon. Histological study of a case. *Am J Sports Med* 11:14-16, 1983
93. Radford WJP, Amis AA, Stead AC: The ovine stifle as a model for human cruciate ligament surgery. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 9:134-139, 1996
94. Radomsky M, Merck A, Gonsalves M, Anudokem G, Poser J. Basic fibroblast growth factor in a hyaluronic acid gel stimulates intramembranous bone formation. 22, 510. 1997. San Francisco CA. Ref Type: Conference Proceeding
95. Rostrup O: Reconstruction of the anterior cruciate ligament. *West J Surg Obstet Gynecol* 72:199-202, 1964
96. Roux W: *Die Entwicklungsmechanik*, Leipzig, 1905
97. Rubin RM, Marshall JL, Wang J: Prevention of knee instability. Experimental model for prosthetic anterior cruciate ligament. *Clin Orthop* 113:212-236, 1975
98. Rushton N, D'Amico DJ, Naylor CPE: Clinical, arthroscopic and histological findings after replacement of the anterior cruciate ligament with carbon-fibre. *J Bone Joint Surg (B)* 65:308-309, 1983
99. Schürch W, Seemeyer T, Gabbiani G: The myofibroblast: A quarter century after its discovery. *Am J Surg Pathol* 22:141-147, 1998
100. Sckell A, Leunig M, Fraitzl CR, Ganz R, Ballmer FT: The connective-tissue envelope in revascularisation of patellar tendon grafts. *J Bone Joint Surg* 81B:915-920, 1999
101. Seemayer TA, Lagace R, Schurch W, Tremblay G: Myofibroblasts in the stroma of invasive and metastatic carcinoma: a possible host response to neoplasia. *Am J Surg Pathol* 3:525-533, 1979

102. Second PF: Recherches clinique et expérimentales sur les épanchements sanguins du genou par entorse. *Prog Méd* 16:297-421, 1879
103. Serini G, Gabbiani G: Mechanisms of Myofibroblast Activity and Phenotypic Modulation. *Exp Cell Res* 250:273-283, 1999
104. Shino K, Inoue M, Horibe S, Nakata K, Maeda A, Ono K: Surface blood flow and histology of human anterior cruciate ligament allografts. *Arthroscopy* 7:171-176, 1991
105. Simank HG, Graf J, Schneider U, Fromm B, Niethard FU: [Demonstration of the blood supply of human cruciate ligaments using the plastination method]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 133:39-42, 1995
106. Skalli O, Pelte MF, Peclet MC, Gabbiani G, Gugliotta P, Bussolati G, Ravazzola M, Orci L: Alpha-smooth muscle actin, a differentiation marker of smooth muscle cells, is present in microfilamentous bundles of pericytes. *J Histochem Cytochem* 37:315-321, 1989
107. Slocum DB, James SL, Larson RL: Clinical test for anterolateral rotatory instability of the knee. *Clin Orthop* 118:63-69, 1976
108. Smith A: The diagnosis and treatment of injuries of the crucial ligaments. *Br J Surg* 176-189, 1918
109. Stark J: Two cases of ruptured ligaments of the knee-joint. *Edinburgh Med Surg* 74:267-271, 1850
110. Starr DE: Repair of old ligamentous injuries of the knee. *Clin Orthop* 23:162, 1962
111. Stopak D, Harris A: Connective tissue morphogenesis by fibroblast traction. I. Tissue culture observations. *Dev Biol* 90:383-398, 1982

112. Tackmann W: Das Binde und Stützgewebe. In: *Auxilium-Repetitorien der Histologie I* pp 58-89. Berlin, 1994
113. Tohyama H, Yasuda K: Significance of graft tension in anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 6:S30-S31, 1998
114. Torg JS, Conrad W, Kalen V: Clinical diagnosis of anterior cruciate ligament instability in the athlete. *Am J Sports Med* 4:84-91, 1976
115. Unterhauser F, Bail H, Höher J, Haas N, Weiler A: Endoligamentous revascularisation of an anterior cruciate ligament graft. *Clin Orthop* 415:in press, 2003
116. Vandekerckhove J, Weber K: At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J Mol Biol* 126:783-802, 1978
117. Vandekerckhove J, Weber K: Mammalian cytoplasmic actins are the products of at least two genes and differ in primary structure in at least 25 identified positions from skeletal muscle actins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:1106-1110, 1978
118. Vaughn LC: A study of the replacement of the anterior cruciate ligament in dog by fascia, skin and nylon. *Vet Rec* 75:537-541, 1963
119. Warme WJ, Feagin JA, Jr., King P, Lambert KL, Cunningham RR: Ski injury statistics, 1982 to 1993, Jackson Hole Ski Resort. *Am J Sports Med* 23:597-600, 1995
120. Weiler A, Hoffmann RFG, Bail H, Rehm O, Sudkamp N: Tendon healing in a bone tunnel. Part II: Histologic analysis after biodegradable interference fit fixation in a model of anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Arthroscopy* 18:124-135, 2002

121. Weiler A, Peine R, Pashmineh-Azar R, Abel C, Sudkamp NP, Hoffmann R: Tendon healing in a bone tunnel Part I: Biomechanical results after biodegradable interference fit fixation in a model of anterior cruciate ligament reconstruction in sheep. *Arthroscopy* 18:113-123, 2002
122. Weiler A, Peters G, Maurer J, Unterhauser FN, Sudkamp NP: Biomechanical properties and vascularity of an anterior cruciate ligament graft can be predicted by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. A two-year study in sheep. *Am J Sports Med* 29:751-761, 2001
123. Weiler A, Unterhauser FN, Bail HJ, Huning M, Haas NP: Alpha-smooth muscle actin is expressed by fibroblastic cells of the ovine anterior cruciate ligament and its free tendon graft during remodeling. *J Orthop Res* 20:310-317, 2002
124. Wolter D: Die Biokompatibilität von Kohlefasern und Kohlenstoffmikropartikeln. In: *Alloplastischer Bandersatz* Ed by C Burri and Claes L. Bern, Huber, 1983
125. Yasuda K, Hayashi K: Remodeling of Tendon Autograft in Ligament Reconstruction. In: *Biomechanics: Functional Adaptation and Remodeling* pp 214-250. Ed by K Hayashi, A Kamiya, and K Ono. Heidelberg, New York, Springer, 1997
126. Youmans WT: The so-called "isolated" anterior cruciate ligament tear or anterior cruciate ligament syndrome: A report of 32 cases with some observation on treatment, its effect on results. *Am J Sports Med* 6:26-30, 1978
127. Zimmerman MC, Contiliano JH, Parsons JR, Prewett A, Billotti J: The biomechanics and histopathology of chemically processed patellar tendon allografts for anterior cruciate ligament replacement. *Am J Sports Med* 22:378-86, 1994

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: A. Humanes Kniegelenk mit Blick auf Kreuzbänder und Femurkondylen. B. Ovines Kniegelenk mit Blick auf Kreuzbänder und Femurkondylen..... 13
- Abbildung 2: Schematische Darstellung des Ursprunges und Ansatzes der Kreuzbänder im Kniegelenk (aus F. H. Netter Interactive atlas of human anatomy): A: Ansicht der Femurkondylen von inferior. B: Ansicht des Tibiaplateaus mit Menisken von superior. (VKB = vorderes Kreuzband, HKB = hinteres Kreuzband, MCL = mediales Kollateralband, LCL = laterales Kollateralband, AM = Außenmeniskus, IM = Innenmeniskus) 13
- Abbildung 3: Das vordere Kreuzband des Schafes läßt sich deutlich in ein kräftigeres antero-mediales (AMB) und ein postero-laterales (PLB) Bündel unterteilen, wobei stets ein Anteil während Beugung und Streckung gespannt ist. A.: Ansicht von ventral, B.: Ansicht von dorsal..... 14
- Abbildung 4: Schematische Zeichnung von Lage und Verlauf der das Knie versorgenden Arterien..... 15
- Abbildung 5: Modell der Fibroblasten-Myofibroblasten Modulation: TGFβ1 wird von Thrombozyten (nicht abgebildet) und Makrophagen freigesetzt. Ursächlich dafür vermutet man die Stimulation dieser Zellen durch GM-CSF. Freigesetztes TGFβ1 aktiviert stromaständige Fibroblasten zur Synthese und Organisation eines dreidimensionalen ECM-Gerüsts, das Fibronectin enthält. Gemeinsam mit TGFβ1 vermag es die Induktion des myofibroblastischen Phänotypen. (TGFβ1 = transformed growth factor β1; GM-CSF = germcell-colonie stimulating factor; ECM = extracellular matrix; ED-A FN = Fibronectin) 20
- Abbildung 6: Versuchstiere in der tierexperimentellen Abteilung der Humboldt-Universität zu Berlin, Charité, Campus Virchow..... 25
- Abbildung 7: Anatomische Studie am Hinterlauf des Schafes. Markiert sind die sich beim Schaf nur sehr dünn und flächig darstellenden Sehnenanteile der Mm. semitendinosus und gracilis(★), sowie M. semimembranosus(#). In der Studie

wurde daher die Sehne des M. flexor digitorum superficialis verwendet, die von der Achillessehne (▲) umhüllt wird.....	25
Abbildung 8: Prüfung der Ausrißfestigkeit der eingebrachten 1,5 fachen Kirchheim-Kessler Sehnennaht.	28
Abbildung 9: Vorspannung des Transplantates mit 60 Nm für ca. für 1 min.....	29
Abbildung 10: Schematische Darstellung des VKB-Ersatzes mittels Flexorsehne und Verankerung mit resorbierbaren Interferenzschrauben auf Gelenkniveau (aus Weiler et al. 2002 (121))	30
Abbildung 11: Darstellung der Unterteilung der Querschnittpräparate in eine subsynoviale, eine intermediäre und eine zentrale Zone zur Quantifizierung der Gefäßdichte und –verteilung (aus Unterhauser et al 2003 (115))	37
Abbildung 12: Makroskopische Kniegelenksaufnahme 6 Wochen nach VKB-Ersatzes mit Darstellung des Transplantates, umgeben von einem stark vaskularisierten Synovialschlauch.....	41
Abbildung 13: A.: 12 Wochen postoperativ zeigt sich das Transplantat noch diskret hypertroph vaskularisiert. B.: Nach 24 Wochen läßt sich das Transplantat (im Bild rechts dargestellt) nicht mehr vom nativen VKB (im Bild links dargestellt) unterscheiden (aus Weiler et al 2002 (121))	42
Abbildung 14: Transplantat, 6 Wochen nach VKB-Ersatz (Masson-Goldner Trichromfärbung (MG)): A: Hyperzellulärer Bindegewebsstrang (MG,400x) B: Fingerförmig einwachsender Bindegewebsstrang (MG, 100x) C: Gefäßdarstellung in einwachsendem Bindegewebsstrang (Immunhistochemie, F.VIII, 100x) (je aus Weiler et al 2001 (122))	43
Abbildung 15: Stark verdickte synoviale Deckschicht mit 5 - 8 Zelllagen, Transplantat 6 Wochen postoperativ (MG 200x).....	43
Abbildung 16: A.: Natives vorderes Kreuzband unter polarisiertem Licht: Es imponiert eine hochfrequente, regelmäßige Kollagentertiärstruktur (polarisiertes Licht 200x). B.: Sehne des M. flexor digitorum superficialis unter polarisiertem	

Licht: Es läßt sich im Vergleich zum nativen VKB eine deutlich niederfrequente Kollagentertiärstruktur abbilden (polarisiertes Licht 200x).	45
Abbildung 17: A/ B.: Nach 6 Wochen zeigt sich eine große Diversität der Kollagentertiärstruktur innerhalb eines Transplantates. Das Bandgewebe zeigt sich hinsichtlich seiner Kollagenstruktur sehr inhomogen. Es lassen sich in dieser frühen Remodelingphase neben neugebildetem hochfrequentem Granulationsgewebe (A) immer noch Abschnitte von avaskulärem und niedrigfrequentem "altem" Transplantatgewebe (B) nachweisen. C.: Nach 9 Wochen zeigt sich das Kollagen zunehmend homogen und es läßt sich nur noch vereinzelt altes niedrigfrequentes Kollagengewebe der Flexorsehen nachweisen. .	46
Abbildung 18: A.: Nach 12 Wochen zeigt sich im Vergleich zum nativen VKB kein signifikanter Unterschied des Kollagencrimps bei jedoch noch deutlicher Irregularität. B.: Nach 24 Wochen steigt die Frequenz der Kollagenwellen weiter an und ist signifikant kürzer als im nativen VKB, sowie nach 9 und 12 Wochen.	47
Abbildung 19: A.: Nach 52 Wochen zeigt sich eine homogene hochfrequente Kollagenstruktur. B.: Nach 104 Wochen imponiert weiterhin eine hochfrequente Kollagenstruktur mit signifikant geringerem Wellenabstand im Vergleich zum nativen VKB.	47
Abbildung 20: A.: Die immunhistologische Färbung des nativen vorderen Kreuzbandes zeigt F. VIII (von Willebrandt Faktor) positive Gefäßendothelzellen. Die Gefäße liegen in bindegewebigen Septen von den regelmäßig geformten Kollagenfasern getrennt (100x). B.: Darstellung der Gefäßquerschnitte in der Sehne des M. flexor digitorum superficialis zum Zeitpunkt Null. Die Immunhistologische Anfärbung von F. VIII zeigt nur vereinzelte Gefäßquerschnitte umhüllt von dünnen bindegewebigen Membranen zwischen den Kollagenfaszikeln (100x) (aus Unterhauser et al 2003 (115)).	48
Abbildung 21: A.: Signifikant erhöhte Gefäßdichte der subsynovialen und intermediären Schichten nach 6 Wochen (Immunhistologie F.VIII 50x). B./ C.: Hypervaskularität der synovialen Deckzellschicht mit Gefäßen die in bindegewebigen Septen von Peripher nach Zentral einziehen (Immunhistologie F.VIII 200x)	49

- Abbildung 22: A.: Synoviale und subsynoviale Hypervaskularität 9 Wochen nach VKB-Ersatz. (Immunhistologische Färbung F.VIII, 50x) B: Hypervaskularisierung des Transplantates nach 9 Wochen bis in die zentralen Anteile (Immunhistologische Färbung F.VIII, 200x) 50
- Abbildung 23: A.: Nach 12 Wochen zeigt sich eine deutlich reduzierte Vaskularität der subsynovialen Schicht, im Vergleich mit den 6 und 9 Wochen Präparaten. Es formieren sich erstmalig bindegewebige Septen, welche die Gefäße von den kollagenen Fasern trennen (Immunohistochemie Faktor VIII, 200x). B.: Nach 24 Wochen sind alle Gefäße vollständig von einer bindegewebigen Hülle umschlossen und gänzlich von den kollagenen Fasern getrennt. Bis auf die zentrale Schicht sind Gesamtzellzahl und Gefäßstatus des nativen vorderen Kreuzbandes erreicht (Immunohistochemie Faktor VIII, 200x) (aus Unterhauser et al 2003 **(115)**) 50
- Abbildung 24: A.: Nach 52 Wochen hat das Transplantat den Gefäßstatus des vorderen Kreuzbandes erreicht (Immunhistochemie, F.VIII, 200x). B.: Nach 104 Wochen läßt sich keine weitere Veränderung der Vaskularität im Vergleich zum nativen VKB nachweisen (Immunhistochemie, F.VIII, 200x) (aus Unterhauser et al 2003 **(115)**) 52
- Abbildung 25: A.: Die immunhisto-chemische Färbung des intakten VKB zeigt ASMA-positive Myofibroblasten. Die Myofibroblasten sind ungleichmäßig verteilt und weisen eine ovoide Zellform auf (Immunhistologie, ASMA 200x, polarisiertes Licht). B.: Die Myofibroblasten der Flexorsehne weisen einen fusiformen Zellkern auf und sind gleichfalls unregelmäßig verteilt (Immunhistologie, ASMA 200x, teil-polarisiertes Licht) (Weiler et al 2002 **(123)**) 52
- Abbildung 26: A.: Nach 6 Wochen zeigt sich eine deutliche Myofibroblastenexpression in einwachsendem Granulationsgewebe). Es zeigt sich deutlich eine Degradation der Kollagenfasern und ihrer Tertiärstruktur, dem Kollagen-Crimp. Das alte, nicht remodelierte Bandgewebe weist vereinzelte Myofibroblasten auf (Pfeile) (Immunhistologie, ASMA 100x, teil-polarisiertes Licht.) B.: Die weitere Vergrößerung des einwachsenden Granulationsgewebes zeigt neu formiertes Kollagengewebe in dem spindelförmige Myofibroblasten

nachgewiesen werden können (Pfeile). (Immunhistologie, ASMA 100x, teil-polarisiertes Licht) (aus Weiler et al 2002 (123))	53
Abbildung 27: A.: Bei immunhistologischer Färbung mit anti- α -smooth-muscle Aktin werden glatte Muskelzellen von Gefäßen dargestellt. B: In der unmittelbaren Umgebung von Gefäßen lassen sich Myofibroblasten nicht eindeutig von Perizyten unterscheiden (Immunhistochemie, F. VIII, 100x). C.: Nach 24 Wochen lassen sich Myofibroblasten aufgrund ihrer Morphologie von Perizyten und rein intraligamentärer Lage von glatten Gefäßmuskelzellen differenzieren (Immunhistochemie, F. VIII, 400x)	54
Abbildung 28: A.: ASMA exprimierende Myofibroblasten konnten im Kollagenfaserverband nachgewiesen werden (24 Wochen ASMA, 400x) B: Sie zeigten sich longitudinal entlang der kollagenen Fasern orientiert (gleiches Präparat wie A, 400x, polarisiertes Licht)	54
Abbildung 29: A.: Nach 52 Wochen stieg der Anteil der ASMA exprimierenden Myofibroblasten weiter an. Sie wiesen eine ovoide Zellform auf und waren weiterhin unregelmäßig verteilt (Immunhistochemie ASMA, 200x). B.: Nach 104 Wochen stieg der Anteil an Myofibroblasten im Vergleich zum nativen VKB weiter an. Die Zellen zeigten erneut eine ovoide Form (Immunhistochemie ASMA, 200x).....	55

Anhang

Spezielles Op-Instrumentarium

Spezielle Kreuzbandinstrumente

Bohrer 3,2mm

Bohrer 6,0mm

Ösendraht 2,0mm

Dilatator 7,0mm

Hammer

Meißel 5,0mm

Notcher

Tensiometer (bis 60Nm)

Synos Schraubendreher³⁶

Nahtmaterialien

Haut: Ethilon® II 3/0³²

Subcutan: Vicryl® SH 3/0³³

Faszie: Vicryl® SH 1/0³⁴

Haltefäden: Vicryl® CT 1/0 Faden³⁵

Reagenzien und verwendete Pharmaka

Prämedikation: Thiopental (Trapanal®³⁷) als Sedativum

Narkose: Thiopental (Trapanal®) zur Narkoseeinleitung
Stickoxydul als Inhalationsnarkotikum
Isofluran (Forene®³⁸) als halogeniertes Inhalationsnarkotikum

Analgesie: Novaminsulfon (Novaminsulfon-ratiopharm® 2,5 Injektionslsg.³⁹)
Tramadol (Tramal® 100 Injektionslsg.⁴⁰)

³² Ethicon, Norderstedt, Deutschland

³³ Ethicon, Norderstedt, Deutschland

³⁴ Ethicon, Norderstedt, Deutschland

³⁵ Ethicon, Norderstedt, Deutschland

³⁶ Synos medical AG, Wabern-Bern, Schweiz

³⁷ Byk Gulden Lomberg Chem. Fabrik GmbH, Konstanz, Deutschland

³⁸ Abott GmbH, Wiesbaden, Deutschland

³⁹ ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland

⁴⁰ Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland

Untersuchungsmaterialien

Materialien zur histologischen Aufarbeitung

Zur Entparaffinierung und Hydrierung durchliefen die Präparate die absteigende Alkoholreihe (1.).

Nach erfolgter Färbung wurden die Präparate wieder in der aufsteigenden Alkoholreihe (2.) dehydriert.



1. Absteigende Alkoholreihe	2. Aufsteigende Alkoholreihe	Anzahl der Durchgänge	Dauer der Einwirkung	Lösung
		2X	10 min	Xylol
		2X	2 min	100% Alkohol
		1X	2 min	96% Alkohol
		1X	2 min	80% Alkohol
		1X	2 min	70% Alkohol
		1X	kurz durchspülen	Aqua dest.

Tabelle 2: Anleitung zur Verwendung der (1.) absteigenden und (2.) aufsteigenden Alkoholreihe.

Die Präparate wurden anschließend in TBS-Spülpuffer gegeben (pH-Wert=8,2)

Substanz	1L TBS-Spülpuffer-pH:8,2	5L TBS-Spülpuffer-pH:8,2
Trisma HCLT 3253 – Sigma ⁴¹	6,60g	33,0g
Trisma t 1503 Base – Sigma ⁴²	0,90g	4,5g
NaCl ⁴³	8,78g	43,9g

Tabelle 3: Mischungsverhältnis der Grundsubstanzen zur Herstellung des TBS-Spülpuffers pH 8,2

Nach vermischen der Grundsubstanzen wurde mit destilliertem Wasser die jeweilige Gesamtmenge aufgefüllt und der pH-Wert auf 8,2 titriert.

⁴¹ Sigma Chemical Co., P.O. Box 14508 St. Louis, USA

⁴² Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland

⁴³ Natriumchlorid p.-a., Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Übersichtsfärbungen

HE - Färbung (Harris Hämalaun + Eosin)

<i>Methode:</i>
• 5- 6x in Harris Hämatoxylin tauchen (Kernfärbung)
• in Aqua dest. gut spülen
• Differenzierung in 0,75% HCL-Alkohol (entfärbt mitgefärbtes BG, aber auch Kerne! Deshalb nur kurz tauchen!!)
• Bläuen in reichlich warmen Wasser
• (Färbeüberprüfung durch Zwischenmikroskopie: bei schwacher Farbintensität in Aqua dest. spülen und erneut Kernfärben)
• 3- 4x in Eosin (<i>Eosin Y Solution Aqueous, Sigma Diagnostics St.Louis Missouri 63178 USA</i>) tauchen (Cytoplasma- / Kollagenfaserfärbung)

Trichromfärbung nach Masson-Goldner

<i>Methode:</i>
• In Weigerts Eisenhämatoxylin 2-3 min färben (Kernfärbung) (<i>Eisen-Haematoxylin A (2E032) + Eisen-Haematoxylin B (2E052), Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH+Co 73257 Köngen/ N</i>)
• In fließendem Wasser auswaschen 10 min
• In Säurefuchsin-Ponceau 5 min färben. (<i>Poncheau Fuchsin Masson (2C149), Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH+Co 73257 Köngen/ N</i>)
• Spülen in 1% iger Essigsäure
• Differenzierung in Phosphormolybdänsäure Orange G bis das Bindegewebe vollständig entfärbt ist (15 - 30 min).
• Spülen in 1% iger Essigsäure
• Gegenfärben mit Lichtgrün 5 min.
• Spülen in 1% iger Essigsäure

Erklärung an Eides Statt

Ich erkläre hiermit, daß ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl oder Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der schriftlichen Ausarbeitung der vorliegenden Dissertation nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwertige Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Frank Norman Unterhauser
geboren am: 03.04.1973
Geburtsort: München
Eltern: Dr. Norman Unterhauser und
Angela Unterhauser, geb. Kübler
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig

Schulausbildung

1979-1983 Grundschule Schillerschule / Lampertheim
1983-1992 Starkenburggymnasium - Heppenheim
28.05.1992 Hochschulreife am Starkenburggymnasium in Heppenheim

Zivildienst

01.07.92-30.09.93 Kinderneurologie Klinikum Mannheim

Hochschulausbildung

10/93-06/95 **vorklinisches Studium der Humanmedizin** an der
Ruprecht-Karls Universität Heidelberg
28.08.1995 Ärztliche Vorprüfung
ab 10/95 **klinisches Studium der Humanmedizin** an der
Humboldt-Universität zu Berlin
29.08.1996 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
25.08.1998 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

04/99-03/00	<p>Praktisches Jahr</p> <p>Chirurgie: Universitätsklinikum Charité, Campus Virchow Abteilung für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie Abteilung für Viszeralchirurgie und Transplantationsmedizin</p> <p>Orthopädie: Inselspital Bern /Schweiz Abteilung für orthopädische Chirurgie, Prof. Ganz</p> <p>Innere Medizin: Auguste-Viktoria-Krankenhaus Abteilung für Diabetes und Gefäßkrankheiten, Prof. Schüren</p>
19.06.2000	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
01.07.2000 – 31.12.2001	<p>AiP in der Abteilung für Unfall - & Wiederherstellungschirurgie, Charité, Campus Virchow Klinikum; ärztl. Direktor Prof. NP Haas</p>
seit 01.01.2002	<p>Assistenzarzt in der Abteilung für Unfall - & Wiederherstellungschirurgie, Charité, Campus Virchow Klinikum; ärztl. Direktor Prof. NP Haas</p>

Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Unterhauser FN, Bail HJ, Höher J, Haas NP, Weiler A: Endoligamentous revascularisation of an anterior cruciate ligament graft. *Clin Orthop* 2003, 415: 000-000
in press Oktober 2003

Unterhauser FN, Bosch U, Zeichen J, Weiler A: Detection of α -smooth muscle actin containing contractile fibroblastic cells in human knee arthrofibrosis tissue. *Am J Sports Med* submitted 01/2003

Petersen W, Pufe T, Unterhauser F, Zantop T, Mentlein R, Weiler A. The splice variants 120 and 164 of the angiogenic peptide vascular endothelial cell growth factor (VEGF) are expressed during Achilles tendon healing. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2003 May 15

Petersen W, Unterhauser F, Pufe T, Zantop T, Sudkamp NP, Weiler A. The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor (VEGF) is expressed during the remodeling of free tendon grafts in sheep. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2003 May;123(4):168-74. Epub 2003 Feb 12.

Weiler A, Unterhauser FN, Bail HJ, Huning M, Haas NP: Alpha-smooth muscle actin is expressed by fibroblastic cells of the ovine anterior cruciate ligament and its free tendon graft during remodeling. *J Orthop Res* 20:310-317, 2002

Weiler A, Peters G, Maurer J, Unterhauser FN, Sudkamp NP: Biomechanical properties and vascularity of an anterior cruciate ligament graft can be predicted by contrast-enhanced magnetic resonance imaging. A two-year study in sheep. *Am J Sports Med* 29:751-761, 2001

Weiler A, Förster C, Hunt P, Falk R, Jung T, Unterhauser F, Bergmann V, Schmidmaier G, Haas N: The influence of locally applied platelet derived growth factor-BB on free tendon graft remodeling graft after anterior cruciate ligament reconstruction - The use of a biodegradable drug delivery tool in a sheep model. *Am J Sports Med* submitted 12/2002

Publizierte Abstracts

Hoffmann RFG, Unterhauser FN, Bail HJ, Weiler A: Die endoligamentäre Revaskularisierung eines freien Sehnentransplantates nach vorderem Kreuzbandersatz – Immunhistochemische zwei-Jahres Untersuchung am Schaf.

Hefte z. d. Unfallchirurg, 275: 352-354, 1999

Unterhauser FN, Hüning M, Schaser KD, Weiler A: Alpha-Smooth Muscle Actin Expression in Fibroblasten des nativen vorderen Kreuzbandes und seines freien Sehnentransplantates während des späten Remodellings – Immunhistochemische zwei-Jahres Untersuchung am Schaf.

Hefte z. d. Unfallchirurg, 275: 349-351, 1999

Weiler A, Peine R, Pashmineh-Azar R, Unterhauser F, Hoffmann R: Tendon to bone healing under direct interference screw fixation in a sheep model. *Arthroscopy, 14: 437-438, 1998*

17th Annual Meeting, Arthroscopy Association of North America, Orlando 1998

Weiler A, Unterhauser FN, Beck C, Peters G, Mäurer J: Remodeling and endoligamentous revascularization of a free tendon graft after ACL reconstruction – A two year immunohistochemical and MRI study in sheep. *Arthroscopy, 16, 2000,*

18th Annual Meeting, Arthroscopy Association of North America, Miami, 2000

Wissenschaftliche Vorträge

Fischbach F, Bruhn H, Unterhauser F, Ricke J, Wieners G, Schröder RJ Detection of Hyaline Cartilage Defects Using Fat-Suppressed Medium T2-W FSE and T1-W 2D and 3D-GE Pulse Sequences: A Comparative Study at 1.5T and 3.0T.

Highfield MR in clinical applications (2nd international symposium), Bonn, 2003

Faensen B, Unterhauser FN, Hunt P, Bail HJ, Haas NP, Weiler A: Vergleich der Knochen-Sehnen-Heilung bei extrakortikaler Verankerung und anatomischer Interferenzschraubenfixation eines Weichteiltransplantates nach vorderem Kreuzbandersatz.

66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, Berlin 2002

Scheffler SU, Schoenfelder V, Chwastek H, Unterhauser FN, Weiler A: The impact of thermal radio-frequency shrinkage on the mechanical and histological properties of the chronically elongated ACL.

49th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, February 2-5, New Orleans 2003

Unterhauser FN, Hüning M, Südkamp NP, Weiler A: α -smooth muscle actin is expressed in myofibroblasts during ACL remodeling.

9th Congress, European Society of Sports Traumatology, Knee Surgery and Arthroscopy, London, 16-20 September 2000.

Unterhauser FN, Abel C, Haas NP, Weiler A: Biokompatibilität, in-vivo Degradation und ossärer Ersatz einer PDLLA-Interferenzschraube - 2-Jahresstudie am Schaf –.

CAB-(Chirurgische Arbeitsgemeinschaft für Biomaterialien)Tagung Berlin, 18/19.Januar 2002

Unterhauser FN, Hüning M, Schaser KD, Weiler A: Alpha-Smooth Muscle Actin Expression in Fibroblasten des nativen vorderen Kreuzbandes und seines freien Sehnentransplantates während des späten Remodellings – Immunhistochemische zwei-Jahres Untersuchung am Schaf.

63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, Berlin 1999

Unterhauser FN, Bosch U, Zeichen J, Haas NP, Weiler A: Detektion kontraktiller Fibroblasten im Arthrofibrosegewebe des Kniegelenkes.

19. Kongress der deutschsprachigen Arbeitsgemeinschaft für Arthroskopie,
Innsbruck 2002

Weiler A, Faensen B, Unterhauser FN, Hunt P, Bail HJ, Höher J, Haas NP: Comparison of Tendon-to-Bone Healing using Extra-cortical and Anatomic Interference Screw Fixation of Soft Tissue Graft Anterior Cruciate Ligament Reconstruction in a Sheep Model.

10th Meeting of the European Society of Knee Surgery, Sports Traumatology and Arthroscopy, April 23-27, Rom, 2002

Weiler A, Peters G, Mäurer J, Unterhauser FN, Südkamp NP: Biomechanical properties and vascularity of an anterior cruciate ligament graft can be predicted by contrast enhanced magnetic resonance imaging

World Congress on Orthopaedic Sports Trauma, Gold Coast, 2000

Weiler A, Peters G, Mäurer J, Unterhauser FN, Südkamp NP: Biomechanical properties and vascularity of an anterior cruciate ligament graft can be predicted by contrast enhanced magnetic resonance imaging.

26th Annual Meeting, American Orthopaedic Society for Sports Medicine, Sun Valley, 2000

Weiler A, Peters G, Mäurer J, Unterhauser FN, Südkamp NP: Biomechanical properties and vascularity of an anterior cruciate ligament graft can be predicted by contrast enhanced magnetic resonance imaging.

4. Europäischer Unfallkongreß & 64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, Hannover, 2000

Weiler A, Unterhauser FN, Hüning M, Schaser KD, Bail HJ: α -smooth muscle actin expression in fibroblasts of the native ACL and its graft during remodeling - Immunohistochemical two year study in sheep.

46th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, Orlando, 2000

Poster

Unterhauser FN, Weiss M, Bail HJ, Haas NP, Weiler A: Crimp frequency is strongly correlated to myofibroblast density in human tendon tissue.

49th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, February 2-5, New Orleans, 2003

Unterhauser FN, Weiler A, Zeichen J, Höher J, Bosch U: Detection of α -smooth muscle actin containing contractile fibroblastic cells in knee arthrofibrosis tissue.

10th Meeting of the European Society of Knee Surgery, Sports Traumatology and Arthroscopy, April 23-27, Rom, 2002

Unterhauser FN, Weiler A, Bail HJ, Höher J, Haas NP: Endoligamentous revascularisation of a free soft tissue graft after anterior cruciate ligament reconstruction.

10th Meeting of the European Society of Knee Surgery, Sports Traumatology and Arthroscopy, April 23-27, Rom, 2002

Weiler A, Förster C, Unterhauser FN, Hunt P, Jung T, Falk R, Höher J, Haas NP: The Influence of Locally Applied Platelet Derived Growth Factor (PDGF-BB) on Free Tendon Graft Remodeling After Anterior Cruciate Ligament Reconstruction

10th Meeting of the European Society of Knee Surgery, Sports Traumatology and Arthroscopy, April 23-27, Rom, 2002

Unterhauser FN, Weiler A, Bail HJ, Höher J, Haas NP: Endoligamentous revascularisation of a free soft tissue graft after ACL reconstruction.

48th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, February 10-13, Dallas, 2002

Unterhauser FN, Hunt P, Jung T, Höher J, Bergmann H, Weiler A: The effect of locally applied PDGF on cellularity, revascularisation and ultrastructural changes during ACL graft reconstruction.

48th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society, February 10-13, Dallas, 2002

Unterhauser FN, Bosch U, Zeichen J, Haas NP, Weiler A: Nachweis α -smooth-muscle Actin exprimierender Fibroblasten im Arthrofibrosegewebe des Kniegelenkes

66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, Berlin 2002

Weiler A, Hoffmann RFG, Peine R, Unterhauser F, Südkamp NP: Biodegradable interference fit fixation of a „bone-plug-free“ tendon graft in-vivo.

2nd Congress Int. Soc. Arthroscopy Knee Surg. Orthop. Sports Med., Washington, 1999

Wissenschaftliche Preise

1st Poster Award, of the International Society of Arthroscopy, Knee Surgery, and Orthopaedic Sports Medicine, received during the 2nd Congress, Washington, 1999:

Weiler A, Hoffmann RFG, Peine R, Unterhauser F, Südkamp NP: Biodegradable interference fit fixation of a "bone-plug-free" tendon graft in-vivo.

2000 Excellence In Research Award, of the American Orthopaedic Society for Sports Medicine, received during the 26th Annual Meeting, Sun Valley, 2000:

Weiler A, Peters G, Mäurer J, Unterhauser FN, Südkamp NP: Biomechanical properties and vascularity of an anterior cruciate ligament graft can be predicted by contrast enhanced magnetic resonance imaging – A two year study in sheep